STOFFWECHSEL VON ANDROSTENDION UND TESTOSTERON IN MENSCHLICHEM AMNION, CHORION, MYOMETRIUM UND IN MENSCHLICHER DEZIDUA UND PLACENTA QUALITATIVE UND QUANTITATIVE IN VITRO-UNTERSUCHUNGEN

Reinhard Hässler

Diss
München
1984

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534901_0018

AUS DER I. FRAUENKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

DIREKTOR: PROF. DR. MED. J. ZANDER

STOFFWECHSEL VON ANDROSTENDION UND TESTOSTERON IN MENSCHLICHEM AMNION, CHORION, MYOMETRIUM UND IN MENSCHLICHER DEZIDUA UND PLACENTA

QUALITATIVE UND QUANTITATIVE IN VITRO - UNTERSUCHUNGEN

INAUGURAL - DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE
IN DER GESAMTEN MEDIZIN AN DER
LUDWIG - MAXIMILIAN - UNIVERSITÄT
ZU MÜNCHEN

VORGELEGT VON: REINHARD HÄSSLER
AUS OBERAMMERGAU

MÜNCHEN 1983

MIT GENEHMIGUNG DES FACHBEREICHS

MEDIZIN DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

BERICHTERSTATTER:	PROF. DR. MED. H. MICKAN
MITBERICHTERSTATTER:	PROF. DR. MED. J. ZANDER
DEKAN:	PROF. DR. MED. W. SPANN

TAG DER MÜNDLICHEN PRÜFUNG: 28.06.1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Dankvermerk:

Ich danke den Medizinisch - Technischen - Assistentinnen Frau Petra Fünfgelt und Frau Ursula Rogowski für die Einweisung und Hilfe bei den Laborarbeiten.

Ich danke meinem Lehrer, Herrn Prof. Dr. med. H. Mickan für die Überlassung des Themas und dafür, daß er mir im Labor und bei der Auswertung jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

meiner lieben Frau

INHALTSVERZEICHNIS:

1 EINLEITUNG:

1.1 Steroide - Androgene
1.2 Prinzipien des Androgenmetabolismus
1.3 Die fetoplacentare Einheit
1.4 Androstendion und Testosteron
1.5 Amnion und Chorion

2 PROBLEMSTELLUNG:

3 MATERIAL UND METHODE:

3.1 Übersicht
3.2 Substanzen, Berechnungen
3.3 Lösungen
3.4 Zählungen
3.5 Chromatographie, Acetylierung, Oxidation
3.6 Identifizierung
3.7 Die Methode

4 ERGEBNISSE:

4.1 Wiederfindung, Leerinkubationen

A Chromatographie:

4.2 Rf-Werte authentischer Substanzen
4.3 Rf-Werte 14-C-markierter Substanzen und Metabolite
4.4 Zufallsverteilung aller Rf-Werte von Androstendion und Testosteron

B Die Methode betreffende quantitative Ergebnisse:

4.5 Umsatz - Definition
4.6 Statistik der Einfach- und Doppelbestimmungen
4.7-4.11 Quantitativer Einfluß verschiedener Inkubationsbedingungen (inkubierte Menge pro Gewebemenge, Puffermenge, Vorinkubationszeit, Inkubationszeit).

C Qualitative Analyse der Inkubationsexperimente:

4.12 Amnion, Chorion, Dezidua, inkubiert mit Androstendion
4.13 Amnion, Chorion, Dezidua, inkubiert mit Testosteron
4.14 Placenta, inkubiert mit Androstendion und Testosteron
4.15 Myometrium, inkubiert mit Androstendion und Testosteron
4.16 Identifizierung von Androstendion und Testosteron

D Quantitativer Einfluß biologisch vorgegebener Bedingungen auf die Aktivität der 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase:

4.17 Kommentar zu Abbildungen und Ergebnissen
4.18 Eihautgewebe: Oxidation - Reduktion
4.19 Oxidation: Amniongewebe - Choriongewebe
4.20 Reduktion: Amniongewebe - Choriongewebe
4.21 Blasensprung
4.22 fetales Geschlecht
4.23 Schwangerschaftsmitte - 40.Schwangerschaftswoche: Amnion-, Chorion-, Deziduagewebe
4.24 Korrelationstabelle

E Quantitativer Einfluß verschiedener Inkubationszusätze auf die Aktivität der 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase:

4.25 Syntocinon®
4.26 Progesteron bei 17-Stunden-Inkubation von Testosteron
4.27 Progesteron bei 2.5-Stunden-Inkubation von Testosteron
4.28 Progesteron, Androstendion, bei Testosteron-Inkubation
4.29 Progesteron, Testosteron, bei Androstendion-Inkubation

F Quantitative Analyse: Myometrium- und Placentagewebe - Gesamtstoffwechselaktivität aller untersuchten Gewebe:

4.30 Myometrium
4.31 Placenta, Schwangerschaftsende
4.32 Placenta, Schwangerschaftsmitte
4.33 Androstendion und Testosteron bei Placentainkubationen mit Gewebeproben aus 15.-,20.-,40.Schwangerschaftswoche

4.34 - 4.38 Vergleich aller untersuchten Gewebe:
- 4.34 Schwangerschaftsende, Androstendion-Inkubation: Amnion-, Chorion-, Placentagewebe
- 4.35 Schwangerschaftsende, Testosteron-Inkubation: Amnion-, Chorion-, Placentagewebe
- 4.36 Schwangerschaftsmitte, Androstendion-Inkubation: Eihaut-, Dezidua-, Placentagewebe
- 4.37 Schwangerschaftsmitte, Testosteron-Inkubation: Eihaut-, Dezidua-, Placentagewebe
- 4.38 15.-40.Schwangerschaftswoche, Androstendion-Inkubation: Myometriumgewebe

5 DISKUSSION:

6 ZUSAMMENFASSUNG:

7 ANHANG - WERTETABELLEN:

8 LITERATURVERZEICHNIS:

1 EINLEITUNG:

1.1 Steroide (Biosynthese) - Androgene (Struktur):

Die Struktur aller Steroidhormone läßt sich aus der des Cholesterols , aus dem sie in-vivo aufgebaut werden, ableiten. Cholesterol entsteht aus Acetaten. (29).

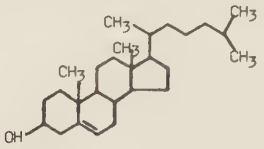


Abb 1: Cholesterol:

Der Umbau von Cholesterol zu 20,22-Dihydroxycholesterol und weiter zu Δ5-Pregnenolon ist der bevorzugt ablaufende gemeinsame erste Schritt bei der Biosynthese aller Steroide. Vom Pregnenolon ausgehend gibt es verschiedene Wege zu anderen Gestagenen, zu Androgenen, Östrogenen, Corticoiden in Geweben wie Nebenniere, Testis, Ovar, Leber u.a.

Die Androgene besitzen 19 Kohlenstoff-Atome, wovon 17 das Perhydrocyclopentenophenantren-Ringsystem bilden. Die beiden übrigen C-Atome bilden Substituenten als C-18 und C-19. A4 (=4Androsten3.17dion) und T(=17ßHydroxy4Androsten3on) unterscheiden sich durch eine Keto- bzw. Hydroxy-Gruppe am C-17-Atom. Beide haben eine Doppelbindung zwischen C-4 und C-5, weshalb sie als "α-ß-ungesättigte Steroide" bezeichnet werden.

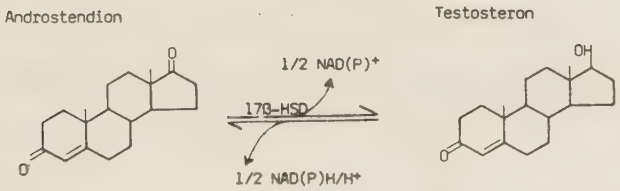


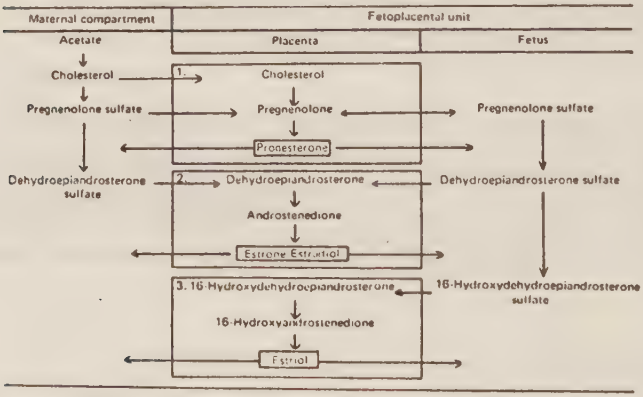
Abb 2: Androstendion und Testosteron 17ß-HSD = 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase

1.2 Prinzipien des Androgenmetabolismus:

Grundsätzliche Möglichkeiten sind Abbau, Aufbau oder Umbau, Konjugation (z.B. mit Schwefelsäure). Die fetoplacentare Einheit baut DHEA zu A4 und T und weiter zu Östron und Östradiol auf. A4 und T werden im mütterlichen Kompartiment und von Männern nur zu einem geringen Prozentsatz metabolisiert (Gandy,23). Mit Abbau ist der Umbau zu 5α- und 5ß-saturierten 3.17-Diketonen gemeint (z.B. 5α-Androstandion) (Gandy,23 , Diczfalusy,17), welche z.T. mit dem Urin ausgeschieden, z.T. weiter metabolisiert (reduziert) und konjugiert (sulfatiert, glucuronidiert) und anschließend ausgeschieden werden (Diczfalusy,17).

1.3 Die fetoplacentare Einheit:

Diczfalusy veröffentlichte 1962 (13) das Konzept, daß Fet und Placenta eine endokrine Einheit bilden. 1964(14,15)folgte eine ausführliche Darstellung: `....., the foetus and placenta form a functional unit to carry out steroid biosynthetic reactions together, which the placenta per se or the foetus per se are incapable of completing´. Ryan stellte 1969 (56) eigene- und Ergebnisse anderer Autoren zu folgendem Diagramm zusammen, das im folgenden Jahrzent nicht entscheidend geändert werden mußte (57):



Major steroid biosynthetic pathways in maternal and fetoplacental compartments
(Ryan KJ: Excerpta Medica Int Congr Ser 183:120, 1969)

Abb 3: Mit persönlicher Erlaubnis,

Das Diagramm zeigt, welche zentrale Stellung A4 (und T)als Östrogenvorstufe in der fetoplacentaren Einheit einnimmt.

1.4 A4 und T in verschiedenen Geweben und Kompartimenten:

Über Steroidkonzentrationen und -metabolismus in mütterlichem und fetalem Plasma, in Placenta, verschiedenen anderen Geweben und im Fruchtwasser existieren zahlreiche Daten. Inkubationsexperimente mit Eihautgewebe wurden bereits mit Gestagenen, Androgenen, Glucocorticoiden durchgeführt (40,41,64,65,66,67,36,44).
Über den Metabolismus der Androgene Androstendion und Testosteron in Eihautgewebe wurde nur wenig veröffentlicht (36,64,66,67).

1.5 Amnion und Chorion:

Das Amnion besteht aus einer Schicht gefäßfreien Bindegewebes, die auf der fetalen Seite mit einschichtig kubischem Epithel besetzt ist. Das Chorion besteht ebenfalls aus gefäßfreiem Bindegewebe, besetzt mit mehrschichtigem Epithel und steht in Kontakt mit der Dezidua capsularis, die mit der Dezidua parietalis verbunden ist (31).

Die Bedeutung der Eihäute bezüglich des Steroidmetabolismus, speziell des Stoffwechsels von A4 und T geht aus den früheren Veröffentlichungen nicht hervor.

Schwartz et al (60) bezeichneten das Amnion als metabolisch hoch aktives Gewebe. Milewich et al (40,41) untersuchten die Progesteron-Reduktion in Eihautgewebe und konnten sowohl eine 20α-HSD, deren Aktivität im Laufe der Schwangerschaft zunimmt, als auch eine 5α-Reduktase, deren Aktivität gegen Ende der Schwangerschaft gegen null geht, nachweisen.

Sulcova et al inkubierten Amnionepithel der 7.-23.SSW mit verschiedenen Steroiden und fanden eine 17ß-HSD für Androgene (64), 7α- und 7ß-Hydroxylierung (65), eine 3ß-HSD/Δ5-4 Isomerase - Aktivität, die in der 8.-9.SSW maximal war und im 2.Trimenon gegen null ging (66). Sie stellten fest, daß A4 und T aus DHEA und aus Androstendiol gebildet werden (66). Einfluß des fetalen Geschlechts auf die Reaktionen wurde nicht beobachtet; die Aktivität der 17ß-HSD in Richtung Steroid-Hydroxylierung nahm im Lauf der Schwangerschaft zu (67). Makaveeva und Gospodinov (36) berichteten 1975, daß im Amnion gegen Schwangerschaftsende eine 17ß-HSD-Aktivität vorhanden ist(Bulg.).

2 PROBLEMSTELLUNG :

1. Welche Metabolite entstehen aus Androstendion und Testosteron bei Inkubation mit Homogenaten von Amnion-, Chorion-, Dezidua-, Myometrium-, Placentagewebeproben verschiedenen Schwangerschaftsalters ?

2. Sind quantitative Unterschiede nachweisbar bezüglich des Stoffwechsels von Androstendion und Testosteron:

   - in Amnion- im Vergleich zu Choriongewebe ?
   - in Abhängigkeit vom Zeitpunkt des Blasensprungs, fetalen Geschlecht, Schwangerschaftsalter ?
   - bei Verwendung der Inkubationszusätze Androstendion Testosteron, Progesteron, Syntocinon ?

3. In welchem Verhältnis stehen die Stoffwechselaktivitäten der Gewebe Amnion, Chorion, Dezidua, Myometrium, Placenta bei Inkubation von Androstendion und Testosteron zueinander ?

3 MATERIAL UND METHODE:

3.1 Übersicht über die Methode:

Wir inkubierten unterschiedliche Mengen 14-C-markierten Androstendions und Testosterons mit Amnion-, Chorion-, Dezidua-,Myometrium-, Placentagewebeproben verschiedenen Schwangerschaftsalters. Die Gewebe wurden homogenisiert, mit und ohne Inkubationszusätze inkubiert und anschließend mehreren Extraktionsvorgängen unterzogen, um die inkubierten Substanzen und deren Metabolite zu isolieren. Die Extrakte wurden chromatographiert, ihre Position auf den TLC-Platten mit Hilfe eines Dünnschichtscanners sichtbar gemacht. Die Steroide wurden getrennt eluiert. Ein Aliquot jeder eluierten Fraktion wurde gezählt. Der Rest wurde gesammelt und identifiziert.

3.2 Radioaktiv markierte Steroide, Berechnungen:

Die 14-C-markierten Steroide wurden bezogen bei: "The Radiochemical Centre, Amersham, England". Sie wurden vor Inkubation durch Säulenchromatographie gereinigt.

Amersham-Angaben zur Markierung:

Androstendion: 58 mCi/mmol (2.15 GBq/mmol), 201.4 µCi /mg (7.45 nBq/mg); daraus folgt: 92.9% der Androstendion-Menge waren radioaktiv markiert.

Testosteron: 59 mCi/mmol, 205 µCi/mg: 95% der Testosteron-Menge waren radioaktiv markiert.

Inkubierte Mengen:

1 Ci = 3.7×10^{10} sec^{-1} = 222×10^{10} sec^{-1} = 2.2×10^{12} dpm.

94% Zählausbeute ergibt: 1 Ci = 2.1×10^{12} cpm.

Inkubierte Menge: etwa 2.1×10^{5} cpm = o.1 µCi

Amersham-Angabe: 200µCi entspricht 1 mg

Daraus folgt: Pro Gewebeprobe (etwa 1g) wurden etwa 500 ng Androstendion oder Testosteron inkubiert.

Konzentration der inkubierten Substanz im Homogenat:

1 Ci = 2.1×10^{12} cpm; 1 mCi = 2.1×10^{9} cpm

Amersham-Angabe: 58 mCi entspricht 1 mmol

daraus folgt: $$\frac{1 \text{ mmol}}{122 \times 10^{9} \text{ cpm}} = \frac{?}{2 \times 10^{5} \text{ cpm}};$$

$$? = 1.64 \times 10^{-6} \text{ mol/liter} = 0.0016 \text{ mmol/liter}$$

Da 1 Gramm Gewebe in etwa 3 ml Puffer homogenisiert wurde, ergibt sich für das Homogenat: Im Inkubationshomogenat betrug die Konzentration von Androstendion oder Testosteron etwa 0.0004 mM.

Nicht markierte Steroide:

Die Referenzsubstanzen wurden bei Steraloids Inc., bei Merck AG Darmstadt und verschiedenen anderen Firmen und Labors bezogen. Sie wurden vor den Chromatographien durch Umkristallisation gereinigt.

3.3 Lösungen:

Phosphat-Puffer:

Na_2HPO_4 $2(H_2O)$ (0.100 m):

17.8 g wurden mit 900 ml Aqua dest. aufgefüllt, dann mit ungefähr 20 ml HCl auf pH 7.4 eingestellt und mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt.

Tris-Puffer:

12.11 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Merck) wurden in 1000 ml Aqua dest. gelöst und mit 1n-HCl versetzt, bis ein pH von 7.4 erreicht war.

Scintillationsflüssigkeit:

4.0 g 2.5-Diphenol + 0.1 g 1.4-bis-2-(4-Methyl-5-Phenyloxazol)--Benzol wurden mit Toluol auf 1000 ml aufgefüllt.

Färbelösung:

50 ml Essigsäure konz. wurden mit 5 ml Schwefelsäure konz. und mit 0.5 ml Anisaldehyd gemischt. Die gefärbten Substanzen wurden 15 Minuten auf 100 Grad Celsius erhitzt.

Acetylierlösung:

500 µl Essigsäureanhydrid + 4 Tropfen trockenes Pyridin.

Oxidationslösung:

100 ml Essigsäure (96%) + Chromoxid 0.4 g .

3.4 Zählungen:

Für die Zählungen wurde die oben beschriebene Scintillationslösung verwendet. Die getrockneten Proben wurden in 1 ml Methanol gelöst, davon 10 µl entnommen und in 10 ml Scintillationslösung gezählt. Bei geringen cpm-Mengen wurden 100 µl aus 1 ml gezählt. Aus einem bis drei Zähldurchgängen wurde das arithmetische Mittel gebildet.

Die Proben wurden in zwei verschiedenen Geräten gezählt, einem Packard 3380 und einem Packard 2420. Jedes Experiment wurde komplett in je einem der beiden Geräte gezählt, so daß innerhalb eines Experiments keine Umrechnungen nötig waren. Um die inkubierten Mengen verschiedener Experimente vergleichen zu können, wurde ein Umrechnungsdiagramm erstellt,

und zwar aus Werten, die in beiden Geräten gemessen worden waren. Dabei ergab sich die unten dargestellte Abhängigkeit:

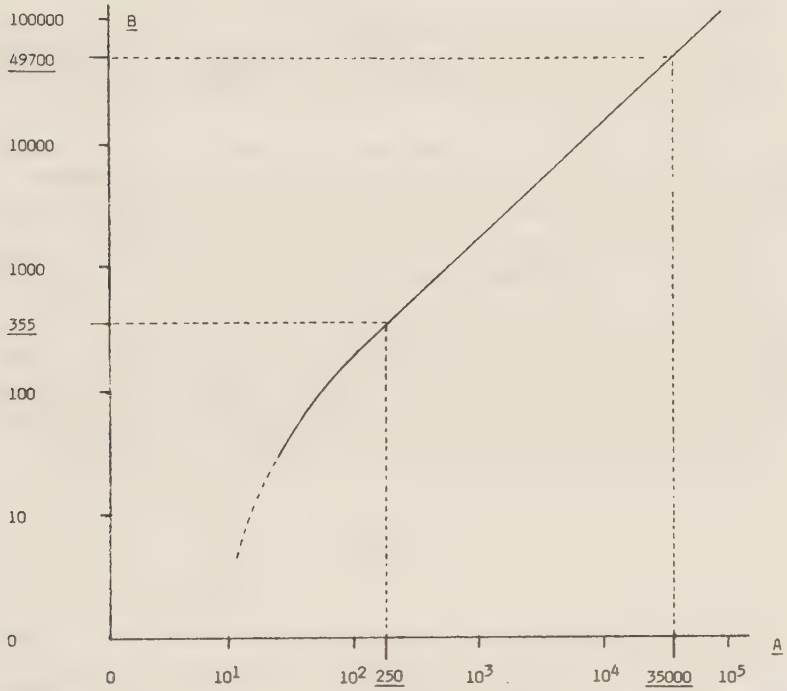


Abb 4: Zähler - Umrechnungsdiagramm:

A = logarithmische Darstellung der gezählten cpm-Mengen des Packard 2420 (natürlicher Log.)
B = logarithmische Darstellung der gezählten cpm-Mengen des Packard 3380 bei den gleichen Proben, wie unter A (natürlicher Logarithmus).

Ab 250cpm (Packard 2420) ≙ 355 cpm (Packard 3380) konstanter Umrechnungsfaktor der Werte.

Die Kurve zeigt, daß eine lineare Abhängigkeit besteht, wenn die gezählten cpm-Mengen größer sind, als 250 (355) cpm. Diese Werte können durch den Faktor 1.42 bzw. dessen Reziprokwert 0.70 ineinander umgerechnet werden. (Der Faktor entspricht dem Verhältnis der Zählausbeuten 66% und 94%). Die Krümmung der Kurve bei cpm-Werten, die kleiner als 250 (355) sind, entsteht durch verschieden exakt abschätzbaren Einfluß der Hintergrundstrahlung bei verschiedener Ausbeute der Zähler. Daher wurden bei der Auswertung kleiner cpm-Mengen gleichzeitig Leerwerte gezählt und subtrahiert, oder Leerzonen eluiert, gezählt und subtrahiert.

3.5 Chromatographie, Oxidation, Acetylierung:

Chromatographien:

Für die Chromatographien wurden mit Kieselgel beschichtete, in Methanol gewaschene Glasplatten verwendet. Die Substanzen wurden in verschiedenen Lösungsmitteln gelöst und mit Glaskapillaren aufgetragen.

Alle untersuchten Substanzen wurden in den Systemen Chloroform-Aceton 9:1 und Benzol-Essigester 2:1 chromatographiert. Einige wurden in den gleichen Systemen rechromatographiert oder in anderen Systemen weiteranalysiert. (Isooctan-Ethylacetat 1:1, Cyclohexan-Ethylacetat 1:1, Methylenchlorid-Ethylacetat-Methanol 85:15:1). Für acetylierte Substanzen wurde das System Benzol-Essigester 5:1 verwendet, für oxidierte das System Benzol-Essigester 2:1.

Die Bahnen mit C-14-markierten Substanzen wurden mit einem Dünnschichtscanner analysiert und Ansammlungen markierter Substanzen als "Peaks" sichtbar gemacht. Diese Peaks wurden eluiert, gezählt und analysiert. Die authentischen Substanzen wurden mit UV-Licht sichtbar gemacht, soweit möglich, oder durch Besprühen mit Aqua dest. oder durch Färbung (Färbelösung unter 3.3).

Chromoxidation:

Die gereinigte, getrocknete Substanz wurde in 1 ml Oxidationslösung aufgelöst und eine Stunde bei +20° C verschlossen aufbewahrt. Dann wurde die Reaktion mit 2 ml Aqua dest. gestoppt. Die Steroide wurden drei mal mit je 3 ml Chloroform-Methanol 2:1 extrahiert, anschließend getrocknet und chromatographiert. Gleichzeitig wurden authentische Substanzen oxidiert und auf den gleichen TLC-Platten chromatographiert. (Oxidationslösung : 3.3)

Acetylierung:

Die getrockneten ,gereinigten Proben wurden in Acetylierlösung (3.3) gelöst und 16 bis 18 Stunden unter Verschluß aufbewahrt,dann unter Stickstoff bei einer Temperatur von 60^0 C getrocknet und zuletzt zusammen mit acetylierten authentischen Substanzen chromatographiert.

3.6 Kristallisation:

Die Kristallisation soll zeigen, ob eine untersuchte Substanz mit einer bekannten Substanz identisch ist.

50 mg der bekannten Substanz werden mit der unbekannten Substanz (weniger, als 0.1 mg) in einem Lösungsmittel gelöst, in dem die bekannte Substanz bei Einengung des Lösungsmittels Kristalle bildet. Wenn sich Kristalle gebildet haben, wird das Lösungsmittel möglichst vollständig entfernt und als sog. "Mutterlauge" aufbewahrt.

Die Kristalle sind rein, abgesehen von Verunreinigungen auf ihrer Oberfläche und bestehen zum größten Teil aus der bekannten Substanz, zu einem geringeren Teil aus der unbekannten, wenn diese mit der bekannten identisch ist.

Mit der Mutterlauge werden Verunreinigungen entfernt, also auch die unbekannte Substanz, wenn diese nicht mit der bekannten identisch ist.

Die Mutterlauge wird getrocknet,(wobei Verunreinigungen übrig bleiben) und gewogen und die gewogene Menge gezählt. Dies ergibt die sog. spezifische Aktivität der Mutterlauge 1 in cpm/g.

Die übrigen Kristalle mit den Verunreinigungen an ihrer Oberfläche werden in einem anderen Lösungsmittel aufgeschwemmt, wiederum eingeengt, die Mutterlauge 2 entfernt, Mutterlauge und ein Kristall 2 getrocknet,gewogen und gezählt. Dies wird vier bis fünf mal wiederholt.

Aus der Reihe der entstandenen Wertepaare läßt sich schließen, ob die unbekannte und die bekannte Substanz identisch sind.

Wenn sie identisch sind, bleibt die Relation der Menge der unbekannten Substanz zur Menge der bekannten Substanz konstant. Die Mutterlaugen haben dann etwa die gleiche spezifische Aktivität, wie die Kristalle (in der gesättigten Lösung läuft eine Gleichgewichtsreaktion ab.).

Wenn die Substanzen nicht identisch sind, bleibt nur wenig radioaktiv markierte Substanz, die in diesem Fall zu den Verunreinigungen zählt, an der Oberfläche der Kristalle hängen; der größte Teil wird mit der Mutterlauge entfernt. Die spezifische Aktivität der Mutterlauge muß dann deutlich abnehmen, da mit jeder Mutterlauge ein hoher Prozentsatz der noch vorhandenen Radioaktivität entfernt wird.

Dazu ein Beispiel einer positiven und einer negativen Kristallisation: (Abb 5)

	I	II	III	IV	
Mutterlaugen	657	647	635	633	positive Reihe von Wertepaaren: die eingesetzten beiden Substanzen sind identisch.
Kristalle	646	638	627	622	
Mutterlaugen	800	570	283	152	negative Reihe: Die Substanzen sind nicht identisch.
Kristalle	160	120	30	14	

3.7 Die Methode, ausführliche Beschreibung:

Gewebegewinnung und Aufbereitung:

Die Gewebe wurden sofort nach der Geburt, Sectio, Operation getrennt, mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und mit Fließpapier getrocknet. Vor dem Inkubieren wurden die Gewebe, die gerade nicht bearbeitet wurden, in einem Gefäß im Eisbad gekühlt.

Die getrockneten Gewebe wurden mit der Schere zerkleinert, die zerkleinerten Stückchen vermischt. Aus diesem Grobhomogenat wurden Proben von etwa 1 g abgewogen.

Dann wurde zum Homogenisieren etwa 1.5 ml Puffer (pH 7.4) zugesetzt und durch dreimaliges kurzes Eintauchen des Homogenisators -bei gleichzeitiger Kühlung des Gefäßes im Eisbad- homogenisiert. Jede Probe wurde für sich homogenisiert, der Homogenisator dazwischen jedesmal mit reichlich Aqua dest. gespült und abgetrocknet. Das separate Homogenisieren wurde zur Vermeidung eines systematischen Fehlers vorgenommen. Die Größe des zufälligen Fehlers zeigt die statistische Auswertung der Mehrfachbestimmungen.

Jeder Probe wurde vor dem Inkubieren noch soviel Puffer zugesetzt, daß die Puffermenge etwa der dreifachen Menge der Probe entsprach, außerdem, sofern verwendet, in Kochsalzlösung gelöste Reaktionszusätze, wie Oxytocin,Progesteron,Androstendion, Testosteron, NADPH (NADPH nur bei wenigen Myometriuminkubationen).

Inkubation:

Die Homogenate wurden in Gefäßen, welche die getrockneten 14-C-markierten Substanzen enthielten, inkubiert.

Bei 131 von 152 inkubierten Proben lag die inkubierte Menge zwischen 125000 und 500000 cpm pro Gramm Gewebe.

Die Kontrollen wurden entweder nicht inkubiert, sondern sofort mit Aceton gestoppt, oder vor dem Inkubieren hitzeinaktiviert.

Die Inkubationsgemische wurden 1.5 bis 3 Stunden bei 37° C inkubiert und anschließend mit je 10 ml Aceton gestoppt. (eine Inkubationsreihe wurde 17 Stunden inkubiert).

Extraktion:

Die Proben wurden bei 5000 U/min zentrifugiert, die Überstände abgegossen, die Rückstände 4 mal mit Äthanol-Diäthyläther 3:1, je 10 ml, gemischt, zentrifugiert (6000- 10000 U/min), die Überstände abgegossen und gesammelt.Die gesammelten Überstände wurden in 70%igem Methanol gelöst und in Zentrifugengläser übergeführt. Jeder Probe wurden 50 µg nicht markiertes Androstendion und Testosteron zugesetzt. Nach 24 Stunden Aufbewahrung bei -20° C (Ausfrieren der noch vorhandenen Lipide) wurden die Proben 1 Stunde bei 10000 U/min und -20° C zentrifugiert. Der abgegossene Überstand wurde unter Vacuum eingeengt, mit 2 ml Aqua dest. versetzt und anschließend fünf mal mit je 5 ml Essigester extrahiert. Die Extrakte wurden evaporiert, anschließend in 1.00 ml Methanol aufgenommen und davon 10 µl gezählt. Hieraus wurde die Wiederfindung nach den Extraktionsvorgängen berechnet.

Chromatographie:

Die Proben wurden dünnschichtchromatographiert (Chloroform-Aceton 9:1). Die Lage der Substanzen auf den TLC-Platten wurde mit Hilfe eines Dünnschichtscanners festgestellt.

Elution:

Die sichtbar gemachten Peaks wurden von den Platten geschabt und in 2 ml-Spritzen gefüllt, deren Spitzen mit Filterpapier abgedichtet waren. Aus den Spritzen wurden mit Mischungen von Methanol und Chloroform und Essigester die Steroide eluiert.

Analyse:

1/100 der Extrakte wurde gezählt, der Rest gesammelt und durch Chromatographie und Oxidation und Acetylierung und anschließende Chromatographie und durch Kristallisation analysiert und identifiziert.

4 ERGEBNISSE:

4.1 Wiederfindung, Leerinkubationen, Elutionsfehler:

Wiederfindung nach der Extraktion:

Zur Berechnung der Wiederfindung nach den Extraktionsvorgängen, also vor der 1. Chromatographie konnten von den 161 Inkubationen 108 ausgewertet werden, weil nur bei den letzten 108 Inkubatioenn der inkubierte Totalwert gemessen worden war.

$$n = 108; \qquad \bar{x} = 93\ \%; \qquad s_{n-1} = \pm 5.6\ \%.$$

Der Mittelwert der Wiederfindung ist 93 %.

Wiederfindung der Chromatographien:

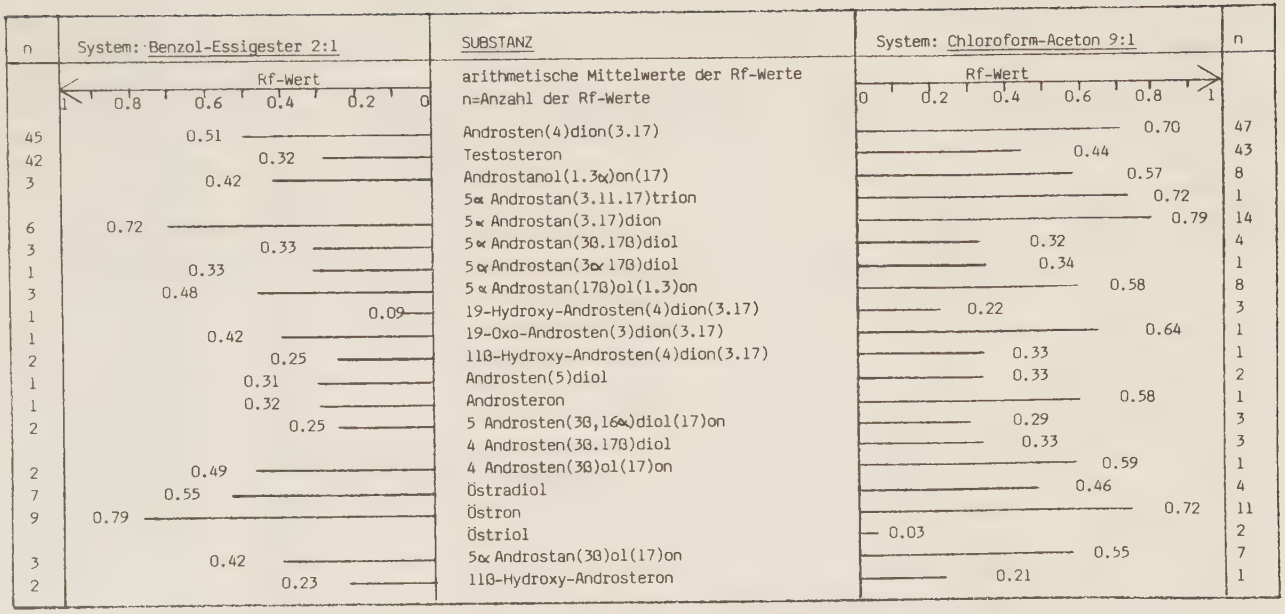
Die durchschnittliche Wiederfindung nach einem Chromatographievorgang und nach Eluieren der Einzelpeaks lag (ausgewertet wurden die ersten 10 Experimente) bei 85 % sowohl nach Benzol-Essigester 2:1-, als auch nach Chloroform-Aceton 9:1 - Chromatographien.

Leerinkubationen:

Leerinkubationen wurden mit hitzeinaktivierten Proben durchgeführt (durch Kochen),oder sofort vor Inkubation mit Aceton gestoppt. Dabei wurden weniger, als 0.5% der inkubierten Substanz metabolisiert, bzw. zerfielen (Dies gilt sowohl für T-, als auch für A4-Inkubationen).

Elutionsfehler:

Bei großen cpm-Mengen: Es wurde untersucht, ob bei großer Substanzmenge (>200000 cpm) eines chromatographierten Peaks Substanz zur Nachbarbahn diffundierte. Dabei stellte sich heraus, daß auf entsprechend großen Feldern der Nachbarbahnen weniger ,als 0.6% der betreffenden Peaks eluierbar waren.
Bei kleinen cpm-Mengen (< 10000 cpm) war, wenn sie in der quantitativen Auswertung verwendet wurden, auf der jeweils gleichen chromatographierten Bahn ein entsprechend großer Bereich ohne Peak eluiert, gezählt und als Leerwert von der gezählten cpm-Menge des "kleinen" Peaks abgezogen worden. Diese Leerwerte lagen im Bereich einiger Hundert cpm .



A Chromatographien:

4.2 Abb 6: Rf-Werte der authentischen Substanzen in den Chromatographiesystemen Benzol-Essigester 2:1 und Chloroform-Aceton 9:1 :

4.3 Rf-Werte der 14-C-markierten Metabolite:

Die Tabelle zeigt die arithmetischen Mittelwerte der gemessenen Rf-Werte (wobei alle Werte incl.Ausreißerwerten verwendet wurden) der bei A4- und T-Inkubation entstandenen Metabolite. Jeder gemessene Wert geht nur in eine Berechnung ein.

Die Abkürzungen in der Tabelle sind unsere Bezeichnungen für die vom Dünnschichtscanner gezeichneten Peaks. Die Lage dieser Peaks in den Chromatographien zeigen die Abbildungen 20-24.

Abb 7: Rf-Werte der 14-C-markierten Metabolite (SD=Standardabweichung; n=Anzahl der Rf-Werte)

Gewebe, inkubiert mit:	Peak	Chromatographiesystem: Chlofoform-Aceton 9:1 Rf-Wert	n	SD	Chromatographiesystem: Benzol-Essigester 2:1 Rf-Wert	n	SD
Amnion und Chorion +A4 +T	A4	0.71	155	±0.04	0.51	50	±0.04
	T	0.44	132	±0.03	0.32	46	±0.03
	X0	0.68	2		0.43	5	(±0.04)
	X1	0.59	8	(±0.03)	0.37	3	
	X2	0.55	19	±0.04	0.46	3	
	X3	0.21	60	±0.02	0.11	1	
	X4	0.16	25	±0.02			
	5a	0.82	6	(±0.03)	0.73	2	
	Y0	0.88	7	(±0.02)	0.72	5	(±0.02)
	Y3	In der "T-Zone"			0.50	12	±0.02
	Y4				0.09	9	(±0.01)
Placenta, +A4, +T	A4	0.72	17	±0.03	0.51	9	(±0.03)
	T	0.44	17	±0.03	0.32	5	(±0.04)
	X5	0.31	18	±0.03			
	X6	0.26	19	±0.02			
	X7	0.16	16	±0.02			
	X8	0.08	10	(±0.01)			
	X9	0.41	1		0.43	5	(±0.03)
	X10	In der "T-Zone"			0.59	5	(±0.02)
	X11	0.81	6	(±0.04)	0.81	13	±0.02
	X12	0.65	5	(±0.05)	0.71	10	(±0.01)
Dezidua +A4,+T	A4	0.73	6	(±0.04)	0.50	3	
	T	0.44	5	(±0.02)	0.31	3	

In Klammern geschriebene Standardabweichungen sollen andeuten, daß aufgrund geringer Werteanzahl das Maß der Standardabweichung nur begrenzte Aussagekraft besitzt.

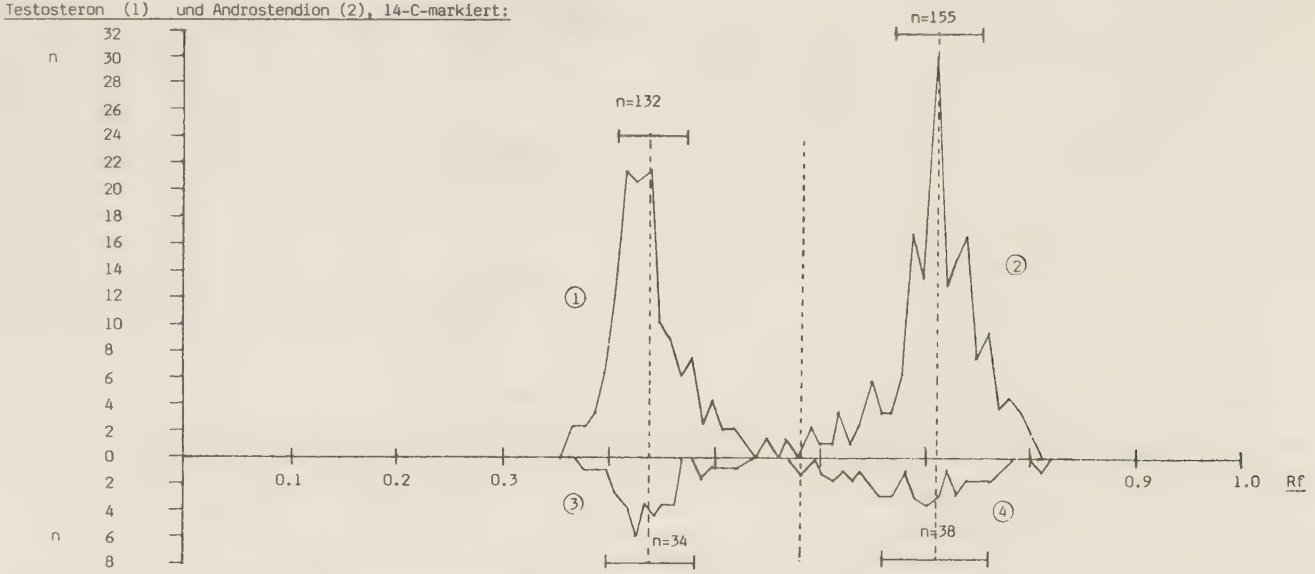
Chromatographien in anderen Systemen, die zur Analyse durchgeführt wurden, aber keine Ergebnisse erbrachten, die nicht schon nach Chromatographie in den System Chloroform - Aceton und Benzol-Essigester bekannt waren, werden nicht beschrieben, ebenso wie die Acetylierungen und Chromoxidationen, die vor Kristallisation zur Orientierung unternommen wurden.

4.4 Zufallsverteilung der Rf-Werte von A4 und T im System Chloroform-Aceton 9:1:

Die Abbildung zeigt die Verteilung aller bei Amnion- und Chorioninkubation erhaltenen Rf-Werte der Metabolite A4 und T und aller auf den gleichen TLC-Platten chromatographierten authentischen Substanzen A4 und T.

Ergebnis: Der Rf-Wert der 14-C-markierten Substanz ist zufällig größer oder kleiner als der Rf-Wert der authentischen Substanz; die 14-C-Markierung hat also unter den gegebenen Bedingungen keinen systematischen Einfluß auf den Rf-Wert von A4 und T.

Testosteron (1) und Androstendion (2), 14-C-markiert:



Testosteron (3) und Androstendion (4),Referenzsubstanzen:

Abb 8: Zufallsverteilung der Rf-Werte von A4 und T im System Chloroform-Aceton 9:1 n = Anzahl der gemessenen Rf-Werte

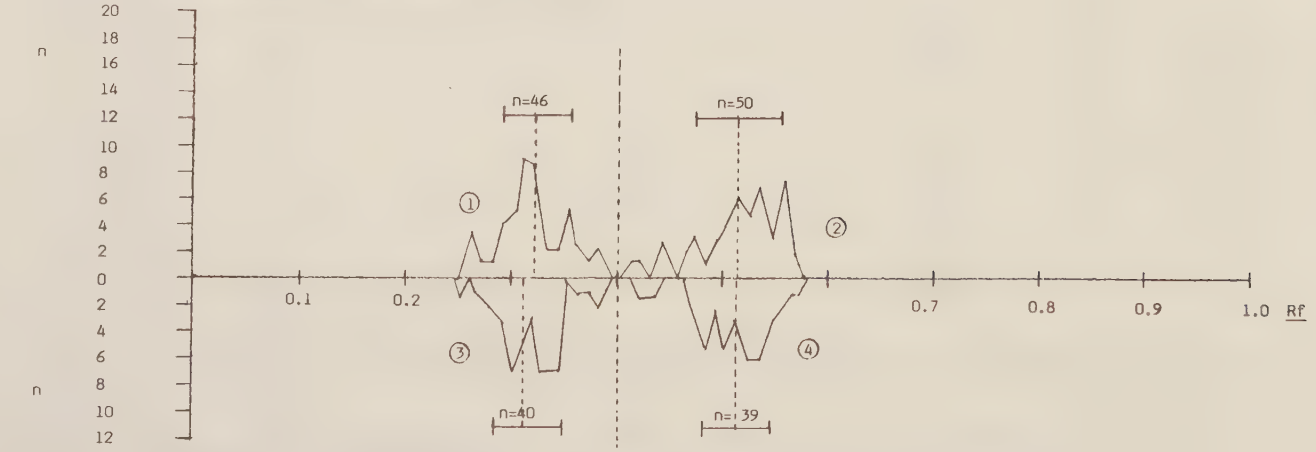
⊢—•—⊣ = Mittelwert der Rf-Werte ± Standardabweichung

Zufallsverteilung der Rf-Werte von A4 und T im System Benzol-Essigester 2:1

Die Abbildung zeigt die Verteilung aller bei Amnion- und Chorioninkubationen erhaltenen Rf-Werte der Metabolite A4 und T und aller auf den gleichen TLC-Platten chromatographierten authentischen Substanzen A4 und T.

Ergebnis: Die 14-C-Markierung hat keinen systematischen Einfluß auf den Rf-Wert unter den gegebenen Bedingungen. Auch bei statistischer Untersuchung der Abweichungen der Rf-Werte zwischen authentischen und markierten Substanzen auf je einer TLC-Platte ergibt sich, daß die Abweichungen zufällig sind (Mittelwert der Abweichungen kleiner als eine Standardabweichung).

Testosteron (1) und Androstendion (2), 14-C-markiert:



Testosteron (3) und Androstendion (4),Referenzsubstanzen:

Abb 9: Zufallsverteilung der Rf-Werte von A4 und T im System Benzol-Essigester 2:1:

n = Anzahl der gemessenen Rf-Werte

⊢⊣ = Mittelwert der Rf-Werte ± Standardabweichung

B Die Methode betreffende, quantitative Ergebnisse:

4.5 Umsatz - Definition:

Für die quantitative Auswertung war es notwendig, den Begriff "Umsatz" abzugrenzen. Er beschreibt, wieviel % einer bekannten inkubierten Menge zu einem Metaboliten umgebaut wurden. Da der gezählte radioaktive Zerfall der markierten Menge proportional ist, wurde der gemessene Zerfall in counts per minute (cpm) als Mengenangabe verwendet. Als Ausgangsmenge (100 %-Wert) hätte die inkubierte Menge verwendet werden können, was jedoch wegen der Verluste bei der Extraktion nicht sinnvoll gewesen wäre. Der gemessene Wert vor der 1.Chromatographie wäre ebenfalls nicht sinnvoll gewesen, weil die Wiederfindung nach den Chromatographien nicht konstant war. Übrig blieb, den cpm-Wert der ganzen chromatographierten Bahn, also die Summe der cpm-Werte der eluierten Peaks einer Bahn als 100%-Wert zu verwenden. (Nachdem die Startpeaks, also die polaren Substanzen von der Ausführung der letzten Extraktion mit Essigester abhängig waren, wurden diese nicht in den 100%-Wert mit eingeschlossen).

Beispiel:

inkubierte Substanz A4: 90000 cpm
Metabolit T : 5000 cpm
Metabolit X : 5000 cpm

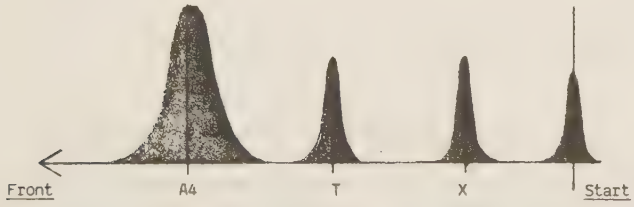


Abb 10: Beispiel zur Umsatzdefinition: Vom Scanner gezeichnetes Elutionsprofil der 14-C-markierten Peaks einer chromatographierten Bahn.

Ergebnisse aus Abb 10:

100% = Summe aller eluierten ,gezählten Peaks mit Ausnahme des Startpeaks = 100000 cpm

$$\text{Umsatz zu T} = \frac{5000 \text{ cpm}}{100000 \text{ cpm}} \% = 5 \%$$

$$\text{Umsatz zu X} = \frac{5000 \text{ cpm}}{100000 \text{ cpm}} \% = 5 \%$$

Gesamtumsatz = Umsatz zu T + Umsatz zu X = 10 %

Die "Gesamtstoffwechselaktivität" bei A4-Inkubation wäre in dem zu Abb 10 gehörenden Gewebe 10% gewesen.

4.6 Statistik der Einfach- und Doppelbestimmungen:

Die statistische Auswertung der Doppelbestimmungen ergab ein Maß, inwieweit auf Ergebnisse von Einzelbestimmungen vertraut werden konnte.(Doppelbestimmung: Nach Gewebegewinnung wurde die gesamte Gewebemenge mit der Schere zerkleinert, die Stückchen gleichmäßig verteilt und anschließend zufällig in einzelne Fraktionen aufgeteilt. Von hier an wurde jede Fraktion für sich weiterbehandelt bis incl. Endanalyse der Umsatzmenge). Zur Auswertung wurden sämtliche durchgeführten Doppelbestimmungen herangezogen, aus jeder Doppelbestimmung der Umsatzwert zu einem Metaboliten (der %-Umsatzzu T bei A4-Inkubation, der %-Umsatz zu A4 bei T-Inkubation), so daß 68 Werte, also 34 Wertepaare zur Verfügung standen.

Standardabweichung:

Zunächst wurde die Differenz von je zwei zusammengehörenden Werten einer Doppelbestimmung berechnet. Einer der beiden Werte erhielt per definitionem den Rang 1, und zwar der Wert, der bei jedem Arbeitsgang als erster bearbeitet wurde. Der Wert mit dem Rang 2 wurde subtrahiert.
So entstanden Differenzen mit positivem oder negativem Vorzeichen. Die Mittelwerte der Differenzen wurden berechnet aus ihrer Summe durch Division durch ihre Anzahl, die Standardabweichungen (SD) aus der Summe der Abweichungsquadrate (SAQ):

$$SD = \pm \sqrt{SAQ\ /n-1} \qquad = \pm \sqrt{(x_i - \bar{x})^2/n-1}$$

n = Anzahl der Wertepaare = Anzahl der Differenzen

x_i= Differenzen 1,2,.....,n;

$\bar{x}$ = Mittelwert der Differenzen (= Summe dividiert durch n).

Die 34 Wertepaare (Tabelle im Anhang) wurden in 3 Gruppen aufgeteilt entsprechend der Größe des Umsatzes. Es ergaben sich folgende Mittelwerte $\bar{x}$ und Standardabweichungen SD
(n = Anzahl der Wertepaare)

Gruppe	Umsatz	n	$\bar{x}$	SD	Abb 11
1	1.2 % - 8.5 %	12	- 0.4 %	± 1.1 %	
2	8.6 % - 12.8 %	11	+ 0.6 %	± 1.3 %	
3	14.5 % - 18.4 %	11	+ 0.3 %	± 0.7 %	
Gesamt	1.2 % - 18.4 %	34	+ 0.2 %	± 1.1 %	

Dieser Prozedur liegt die Annahme zugrunde, daß die Differenzen zufällig entstehen und normalverteilt sind mit definiertem $\bar{x}$ und SD. Dabei sollte $\bar{x}$ im Idealfall = 0 sein. Der Betrag von $\bar{x}$ muß kleiner sein ,als 2 SD, da sonst ein systematischer Fehler vorliegt, also z.B. jeder zweite Doppelwert größer ist, als der erste. Die Tabelle zeigt, daß ein derartiger systematischer Fehler nicht vorliegt. Da sich die Standardabweichungen der Gruppen nicht erheblich unterscheiden von der Gesamtstandardabweichung, kann diese (±1.1 Umsatz%) zur Beurteilung aller Umsatzwerte verwendet werden.

4.7 Einfluß des Quotienten inkubierte Menge/Gewebemenge:

Nachdem der Quotient inkubierte Menge (cpm)/Gewebemenge (g) nicht bei allen Inkubationen konstant war, mußten Werte, die quantitativ verglichen werden sollten,zuerst auf einen gemeinsamen Nenner gebracht werden. Als gemeinsamen Nenner wählten wir einen cpm/g-Quotienten, in dessen Nähe die Quotienten der meißten Inkubationen lagen: 200000 cpm/g. Das Ziel der folgenden Überlegungen ist ein Umrechnungsdiagramm, das es ermöglicht, Umsatzwerte bei individuellen cpm/g -Quotienten zu Werten umzurechnen, welche die entsprechenden Gewebe bei Inkubation mit 200000 cpm/g ergeben hätten. Hierzu wurden 15 Inkubationen mit deutlich verschiedenen cpm/g-Quotienten durchgeführt und die Abhängigkeit des gemessenen Umsatzes vom Reziprokwert des cpm/g-Quotienten (also einem Wert mit der Einheit g/cpm) graphisch dargestellt.

Theoretische Herleitung des Umrechnungsdiagramms:

Entscheidend ist, daß wir vom %-Umsatz der inkubierten Substanz zu einem Metaboliten in der gegebenen Inkubationszeit sprechen. Die Herleitung erfolgt anhand der folgenden Abbildung 12 (a,b,c,).

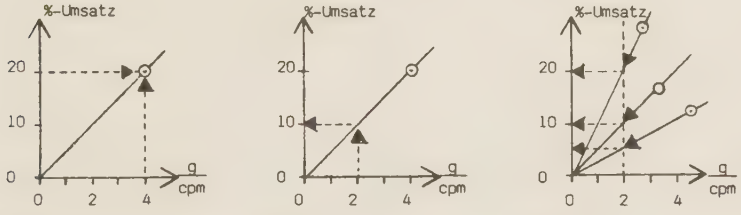


Abb 12 a Abb 12 b Abb 12 c

Theoretische Herleitung des Umrechnungsdiagramms

Abbildung 12 a: Je größer der g/cpm-Quotient, also je größer die Gewebe- und damit die Enzymmenge ist und je kleiner die cpm-Menge ist, ein desto größerer Anteil der inkubierten cpm-Menge kann in der gegebenen Inkubationszeit umgesetzt werden. Wenn die Gewebemenge 0 ist,findet kein Umsatz statt. Aus der fiktiven inkubierten Menge von 0.25 cpm/g und dem fiktiven Umsatz von 20% ergibt sich mit Hilfe des Reziprokwerts 1/0.25 cpm/g = 4g/cpm die Gerade in Abb 12a.
Abbildung 12 b: Bei Inkubation der gleichen cpm-Menge mit der Hälfte der Menge des gleichen Gewebes wie oben (also der Hälfte der Enzymmenge) ergibt sich ein g/cpm-Quotient von 2 und mit Hilfe der Kurve ein Umsatz von 10%,also der Hälfte.
Abbildung 12 c: Für verschiedene Gewebe ergeben sich verschiedene Geraden durch 0.Für jedes Gewebe, also jede Gerade kann, wenn die Gerade durch ein Inkubationsergebnis bekannt ist, der Umsatz abgelesen werden, der sich für 2g/cpm, das in diesem Fall den gemeinsamen Nenner bildet, ergeben würde.

Die Darstellung durch die Geraden ist allerdings vereinfachend, da sich die Bedingungen bei kleiner werdendem g/cpm-Quotienten ändern: Die Reaktionsgeschwindigkeit ist nicht unendlich groß, da zur Reaktion das zufällige Zusammentreffen von Enzym und Substrat und das zufällige Auftreffen des Kofaktors NAD(P)+ - NAD(P)H/H+ notwendig ist, der nicht in optimaler Konzentration vorliegt. Bei kleinen g/cpm-Quotienten, also kleiner Enzym- und Kofaktorenmenge pro cpm-Menge liegt ein größerer Prozentsatz der Enzym- und Kofaktorenmenge für einen definierten Zeitraum in substratgebundener Form vor (der Anteil freien Enzyms und freien Kofaktors ist geringer), was dazu führt, daß der %-Umsatz des Substrats in der gegebenen Inkubationszeit überproportional geringer wird, die Kurve gegen den Nullpunkt des Diagramms steiler. (Da die Gewebemengen außerdem in den Experimenten etwa konstant waren, muß die cpm-Menge hyperbolisch gegen unendlich gehen, damit der g/cpm-Quotient gegen 0 geht. Somit wird der oben beschriebene Mechanismus gegen 0 überproportional wirksam ,die Kurve steiler gegen 0.)

Mit Hilfe der Meßwerte zu dieser Fragestellung und der oben genannten Überlegungen läßt sich das Umrechnungsdiagramm Abb 13 erstellen. Mindestens 2 Inkubationsergebnisse je eines Gewebes ergeben eine Kurve des oben genannten Kurvenbündels. Dabei sind nur Werte aussagekräftig, die auf der horizontalen Achse des Diagramms möglichst weit auseinander liegen, deren g/cpm-Quotienten sich also deutlich unterscheiden, da bei diesen Werten die zufällige vertikale-, also Umsatzabweichung (im Diagramm als $\pm$ Standardabweichung gekennzeichnet) die Lage der Kurve nur wenig beeinflußt. Bei eng benachbarten Werten (geringem g/cpm-Unterschied) entsteht durch den zufälligen Fehler eine Verzerrung der Steigung der Kurve. Daher sind die Wertepaare Nr.3 und Nr.4 nicht verwendbar, obwohl Nr.4 gut in die Kurve passen würde und die ersten vier Werte der Kurve Nr.5 müssen zu einem Wert zusammengefaßt dem fünften Wert gegenübergestellt werden. Die Kurve Nr.6 wäre im Diagramm 60 cm lang und ist daher relativ exakt. Die Wertetabelle zum Diagramm findet sich im Anhang.

Vorgehen bei der Umrechnung:

Die dargestellten Kurven (Abb 13) dienen nur als Orientierungshilfe. Für Umsatzpunkte, die nicht auf den gezeichneten Kurven liegen, müssen parallel verlaufende Kurven durch den jeweiligen Umsatzpunkt extrapoliert werden. Wie oben schon erwähnt, wählten wir als gemeinsamen Nenner den Umsatz, der sich bei 200000 cpm/g ergeben würde. Der Punkt, der sich aus dem gemessenen Umsatz und dem entsprechenden g/cpm-Quotienten im Diagramm ergibt, muß (entsprechend der Ausführung zu Abb 12 c) auf seiner Kurve parallel verschoben werden bis zur 200000 cpm/g = 5×10^{-6} g/cpm- Linie. Horizontal zum Schnittpunkt mit dieser Linie läßt sich der Umsatz ablesen, der sich bei Inkubation des gleichen Gewebes mit 200000 cpm/g ergeben hätte.

Umrechnungsbeispiel:

gemessener Umsatz: 10% bei 180000 cpm inkubierter Menge und 1.35 g Gewebemenge.
cpm/g-Quotient: 180000 cpm/g ; g/cpm-Quotient: $7.5 \times 10^{-6} \frac{g}{cpm}$;

Mit dem Diagramm ergibt sich daraus: Bei 200000 cpm inkubierter Menge pro Gramm Gewebemenge würde der Umsatz des gleichen Gewebes 8.5% betragen.

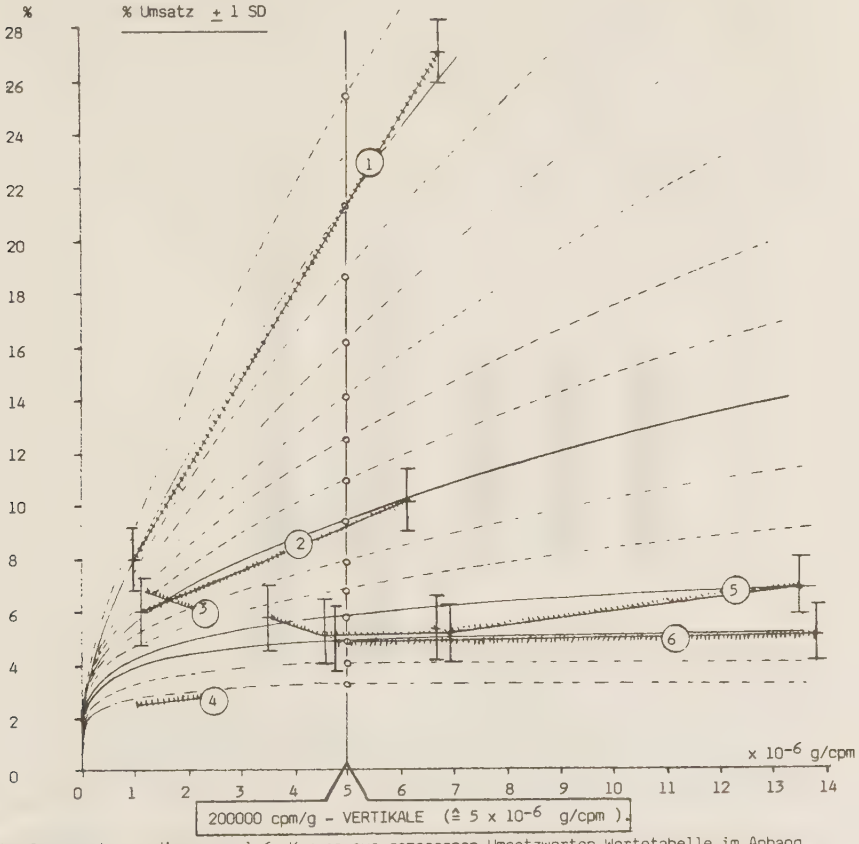


Abb 13: Umrechnungsdiagramm: 1-6: Kurven aus gemessenen Umsatzwerten, Wertetabelle im Anhang.

131 der 152 Inkubationsergebnisse mit Eihautgewebe liegen bezüglich des g/cpm -Quotienten zwischen 2×10^{-6} und 8×10^{-6}, also im Bereich , wo die Kurve noch beinahe eine Gerade ist. 10 weitere Werte liegen zwischen 8×10^{-6} und 11×10^{-6} g/cpm.

4.8 Statistik der Umsatzwerte für 200000 cpm/g:

Die Umrechnungsmethode von Kapitel 4.7 ermöglicht eine Berechnung der Wertepaare der Doppelbestimmungen zu Doppelwerten, die sich bei inkubierten 200000 cpm pro Gramm Gewebe ergeben hätten.
Diese Doppelwerte für 200000 cpm/g lassen sich ebenso statistisch berechnen, wie die gemessenen Doppelwerte in Kapitel 4.6. Für die 200000 cpm/g-Doppelwerte ergibt sich eine Gesamtstandardabweichung von ± 1.2 %.
Obwohl diese Standardabweichung geringfügig höher ist,als die Standardabweichung der gemessenen Umsatzwerte (± 1.1 %), wenden wir sie für die Werte der quantitativen Auswertung an, da diese Werte nach der entsprechenden Umrechnungsmethode (4.7) berechnet wurden. (Wertetabelle im Anhang).

4.9 Einfluß der Puffermenge bei Inkubation von A4:

Fragestellung: Welchen Einfluß haben verschiedene Mengen des Phosphat- und Tris-Puffers auf den Umsatz A4 -> T ?

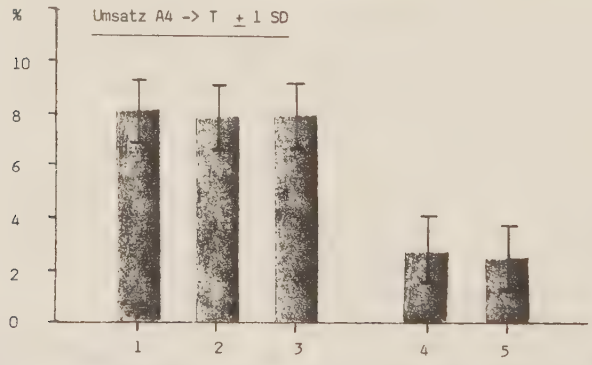


Abb 14: Chorion-(1,2,3) und Amnionproben(4,5), inkubiert mit A4 unter Verwendung verschiedener Pufferarten und Puffermengen.

1 = Phosphat-Puffer, 30%-Homogenat (1g Gewebe + 2.5 ml Puffer) pH 7.4
2 = Phosphat-Puffer, 13%-Homogenat (1g Gewebe + 6.5 ml Puffer) pH 7.4
3 = Tris-Puffer, 25%-Homogenat (1g Gewebe + 3.0 ml Puffer) pH 7.4
4 = Phosphat-Puffer, 30%-Homogenat (1g Gewebe + 2.5 ml Puffer) pH 7.4
5 = Phosphat-Puffer, 13%-Homogenat (1g Gewebe + 6.5 ml Puffer) pH 7.4

Wertetabelle im Anhang

Ergebnis:

Der quantitative Einfluß der in den Experimenten verwendeten verschiedenen Puffermengen und Pufferarten kann vernachlässigt werden.

4.10 Einfluß der Vorinkubation:

Fragestellung: Wie wirkt sich Vorinkubation ohne Substratzusatz bei 37° C auf die Aktivität des untersuchten Enzyms aus ?

Experimentelles Vorgehen:

6 Chorionproben wurden homogenisiert. 4 davon wurden sofort bei Inkubationsbeginn mit 14-C-markiertem T versetzt, die beiden übrigen nach einer Stunde Aufenthalt im Inkubator.Die ersten 4 Proben wurden nach 2.5 Stunden mit Aceton gestoppt, die letzten beiden nach insgesamt 3.5 Stunden.

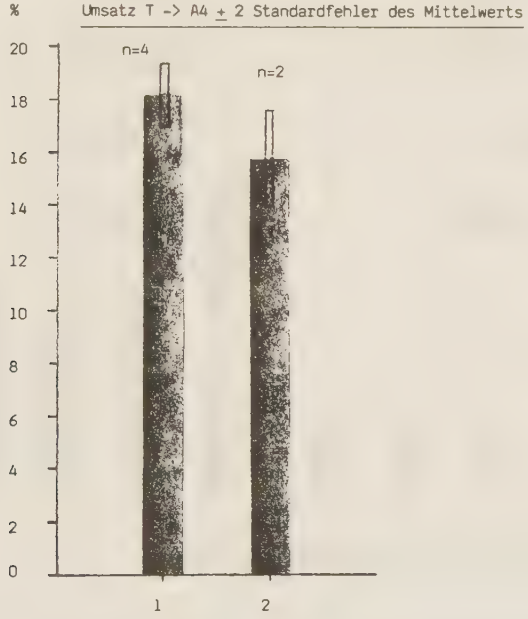


Abb 15: Chorionproben, inkubiert mit T, mit (2) und ohne(1) Vorinkubation.

n = Anzahl der unter gleichen Bedingungen inkubierten Gewebeproben = Mehrfachbestimmungen.
Wertetabelle im Anhang

Ergebnis:

Das Experiment zeigte, daß der Umsatz T -> A4 bei den Proben mit Vorinkubation (1 Stunde bei 37° C) geringer war, als bei den Proben ohne Vorinkubation (ohne Vorinkubation 17.8%-, mit Vorinkubation 15.6% -Umsatz). Der zweifache Standardfehler des Mittelwerts lag bei beiden Mittelwerten unter ± 1.8%.

4.11 Einfluß der Inkubationszeit auf den Umsatz:

Fragestellung: Wie wirken sich verschiedene Inkubationszeiten bei der Inkubationstemperatur 37° C unter den Versuchsbedingungen auf den Umsatz der 17ß-HSD aus ?

Experimentelles Vorgehen:

Bei Exp. XIII wurden verschiedene Proben zwei oder drei Stunden bei 37° C inkubiert. Eine Probe wurde ohne Inkubation sofort mit Aceton gestoppt und analysiert wie die anderen.

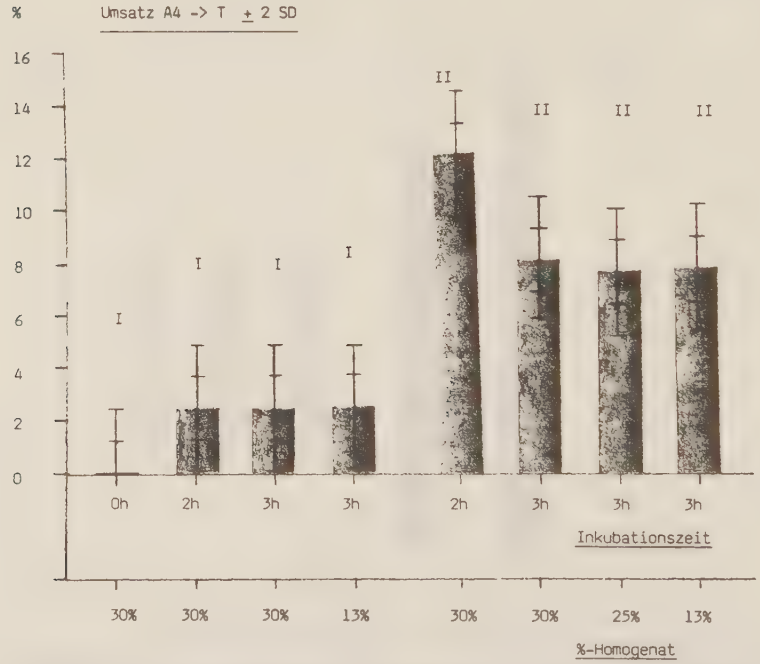


Abb 16: Amnion-(I) und Chorionproben (II), inkubiert mit A4 unter Verwendung verschiedener Inkubationszeiten und Puffermengen. Wertetabelle im Anhang

Ergebnis:

Die Werte lassen keine eindeutige Aussage zu, wie sich verschiedene Inkubationszeiten auf den Umsatz auswirken. Daher wurde eine weitere Inkubationsreihe durchgeführt mit einer größeren Anzahl von Inkubationen bei verschiedenen Inkubationszeiten (Abb 17,18,19).

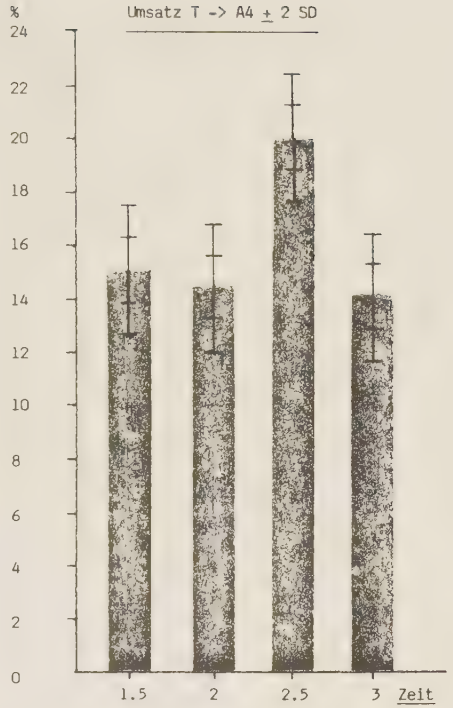


Abb 17: Choriongewebe, inkubiert mit T mit verschiedenen Inkubationszeiten.

Wertetabellen im Anhang

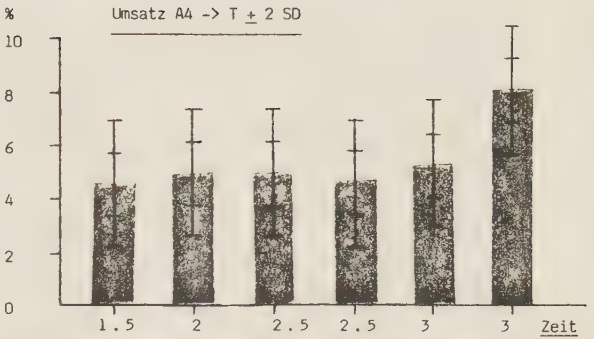


Abb 18: Amniongewebe, inkubiert mit A4 mit verschiedenen Inkubationszeiten

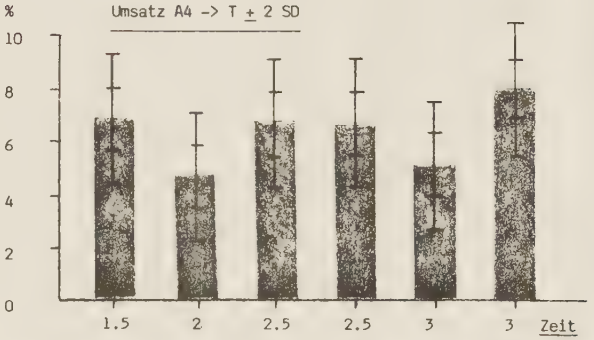


Abb 19:Choriongewebe,inkubiert mit A4 mit verschiedenen Inkubationszeiten

Gesamtergebnis zu Einfluß von Inkubationszeit und Puffermenge:

Abb 16,17,18,19: Mit der Fragestellung, ob eine Variation der Inkubationszeit zwischen 1.5 und 3 Stunden und eine Variation der Puffermenge zwischen 13%- und 30%-Homogenat bei verschiedenen Gewebeproben eines Inkubationsexperiments Umsatzdifferenzen der Einzelproben verursacht, wurden 23 Proben inkubiert. Unter der Annahme, daß Umsatzwerte des gleichen Gewebes sich nicht unterscheiden, wenn ihre + 1-fache Standardabweichung einen gemeinsamen Wert einschließt, existiert für 19 der 23 Proben ein gemeinsamer Wert bei jedem Gewebe. Für 3 der 23 Werte existiert, wenn das 2-fache Intervall der Standardabweichung als Voraussetzung genommen wird, ebenfalls ein gemeinsamer Wert. Ein Wert der 23 Umsätze liegt außerhalb dieser Grenzen.

Bei den Inkubationen der quantitativen Analyse wurde eine Inkubationszeit zwischen 2 Stunden 30 Minuten und 2 Stunden 45 Minuten bei einer Variation der Puffermenge von 25%- bis 30%-Homogenat eingehalten.

Die Definition der Standardabweichung beinhaltet, daß 68% der Messungen des gleichen Wertes entsprechend einer Gaußschen Verteilung im $\pm$ -Intervall der Standardabweichung (96 % der Werte im $\pm$ 2-fachen Intervall) liegen. Dies bedeutet für die Ergebnisse der Abb 16 - 19, daß es sich um Messungen jeweils gleicher Umsätze handeln kann, daß also die Inkubationen der quantitativen Analyse als unter gleichen Versuchsbedingungen durchgeführte Experimente angesehen werden können, was Inkubationszeit und Puffermenge anbelangt und damit qualitativ und quantitativ vergleichbar sind.

C Qualitative Analyse der Inkubationen mit biologischem Material:

Die Abbildungen 20 - 24 zeigen typische Elutionsprofile, wie sie vom Scanner entsprechend der Verteilung radioaktiv markierter Substanzen auf den TLC-Platten gezeichnet wurden.

Die wichtigsten Ergebnisse: (Abb 20 - 24)

1. Zunächst fiel auf, daß sich die Profile vonChorion-,Amnion-, Deziduagewebe, auch aus verschiedenen Schwangerschaftsstadien bei A4-Inkubation qualitativ kaum unterschieden (Abb20),während deutliche quantitative Unterschiede bestanden.
2. Ebenso waren die Elutionsprofile von Chorion-,Amnion-,Deziduagewebe nach T-Inkubation qualitativ nicht unterscheidbar bei deutlichen quantitativen Unterschieden (Abb 21).
3. Dagegen unterschieden sich die Inkubationen mit Placentagewebe sowohl qualitativ, als auch quantitativ von den Inkubationen mit Amnion-,Chorion-,Deziduagewebe (Abb 23).
4. Bei den Placentainkubationen fiel außerdem auf,daß bei Inkubation mit A4 ein qualitativ und quantitativ ähnliches Profil entstand, wie bei Inkubation mit T (Abb 23).
5. Bei Inkubation von Chorion-,Amnion-,Deziduagewebe mit A4 entstand vor allem T.
6. Bei Inkubation von Chorion-,Amnion-,Deziduagewebe mit T entstand vor allem A4.
7. 5α-Androstandion wurde bei Amnion- und Deziduainkubationen mit A4 ohne Reaktionszusätze nicht aufgefunden und war nur bei einer Chorioninkubation mit A4 erkennbar und bei Myometriuminkubationen mit A4 und wurde daher nicht kristallisiert. Unser Ergebnis ist, daß 5α-Androstandion bei Inkubation von Eihaut- und Deziduagewebe (Dezidua aus Schwangerschaftsmitte) mit A4 ohne Inkubationszusätze nicht, oder in mit der Methode nicht feststellbarer Menge entstand (Ein Umsatz von 1% wäre sowohl sichtbar, als auch meßbar gewesen).
8. Die Elutionsprofile der Myometriuminkubationen mit A4 ähnelten qualitativ den Profilen der Amnion-,Chorion-, Deziduainkubationen. Quantitativ bestanden deutliche Unterschiede.

Die Rf-Werte der in den Abbildungen dargestellten Peaks sind Mittelwerte aller vom Scanner gezeichneten Versionen der betreffenden Peaks. Die Anzahl der zur Mittelwertbildung verwendeten Werte, sowie die Standardabweichungen der Mittelwerte finden sich in den unter 4.2 und 4.3 angeführten Rf-Wert-Tabellen.
Die Relation der gezeichneten Breite der Peaks zur gezeichneten Bahnlänge (Start - Front) entspricht etwa der Relation auf den TLC-Platten, jedoch entsprechen die betreffenden Kurvenintegrale keinesfalls den tatsächlichen Substanzmengen.

4.12, Abb 20: Elutionsprofile der Inkubationen von Chorion-, Amnion-,Deziduagewebe mit A4:

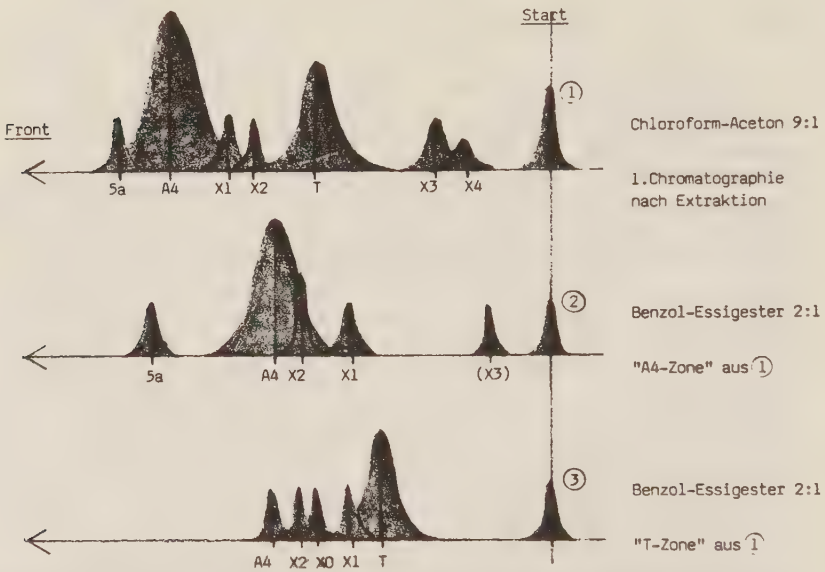


Abb 20/① zeigt die erste Chromatographie im System Chloroform-Aceton 9:1 nach der Extraktion.
Die Summe der Peaks X1,X2,X3,X4 machte in der ersten Chromatographie weniger als 1.5% aus.
X3 wurde bei 60 der 76 Amnion- und Chorioninkubationen, die mit A4 inkubiert worden waren, vorgefunden, X4 bei 25 von 76 Inkubationen.

Abb 20/② ist die aus 20/1 eluierte "A4-Zone", chromatographiert im System Benzol-Essigester 2:1.
5a (= 5α-Androstandion) trennte sich, sofern vorhanden, vom A4-Peak.
Die Peaks X1 und X2 stellten sich in 20/2 noch einmal dar, wenn sie nicht nach der 1.Chromatographie eluiert worden waren. Bei getrennter Elution von X1 und X2 und getrennter Chromatographie in Benzol-Essigester 2:1 wanderten die beiden Fraktionen mit den in Abb 20/2 dargestellten Rf-Werten.
X3 aus 20/1 wanderte in Benzol-Essigester 2:1 mit dem Rf-Wert 0.11.

Abb 20/③ zeigt die Chromatographie der "T-Zone" aus 20/1 im System Benzol-Essigester 2:1. Neben X1 und X2 trennte sich ein Peak mit dem Rf-Wert von A4 ab und der von uns mit X0 bezeichnete Peak. Beide wurden, abgesehen von Rf-Wert-Bestimmungen, nicht weiter untersucht.

Der Hauptumsatz bei A4-Inkubation fand in Richtung T statt.

4.13, Abb 21: Elutionsprofile der Inkubationen von Chorion-,Amnion-,Deziduagewebe mit T:

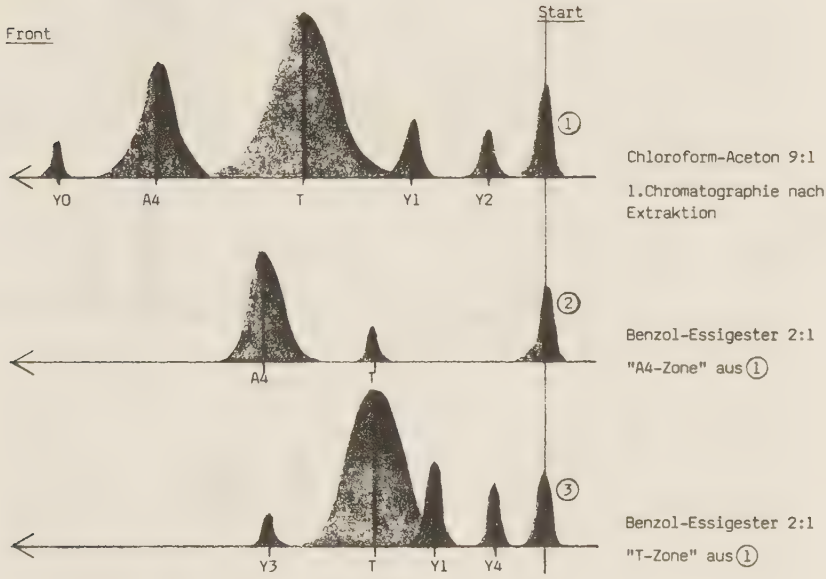


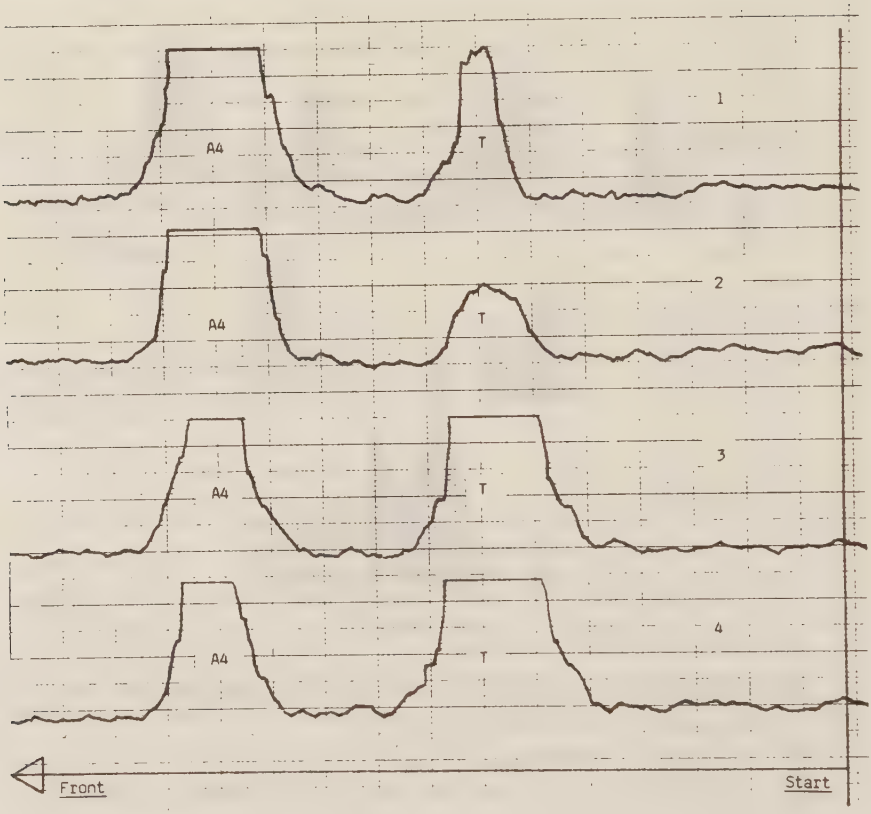
Abb 21/① zeigt die erste Chromatographie (System: Chloroform-Aceton 9:1) der T-Inkubationen mit Amnion-,Chorion-,Deziduagewebe nach der Extraktion.
Die Summe der Umsätze zu Y0,Y1,Y2 machte weniger als 1.7% aus.

Abb 21/② ist die "A4-Zone" aus 21/1, chromatographiert im System Benzol-Essigester 2:1. T, das in der "A4-Zone" miteluiert worden war, trennte sich vom A4-Peak.

Abb 21/③ ist das Elutionsprofil der "T-Zone" aus 21/1 bei Chromatographie im System Benzol-Essigester 2:1. Zwei polare Peaks trennten sich ab. Einer der beiden wanderte mit dem gleichen Rf-Wert, wie der getrennt in Benzol-Essigester 2:1 rechromatographierte Peak Y1 aus 21/1. Er erhielt deshalb ebenfalls die Bezeichnung Y1. Außerdem trennte sich der Peak Y3 ab. Y3 und Y4 wurden nicht weiter untersucht, da sie bei Rechromatographie der T-Zone erneut auftraten und deshalb als Zerfallsprodukte angesehen wurden. Y3 könnte X0 aus Abb 20/1 entsprechen.

Der Hauptumsatz bei T-Inkubation fand in Richtung A4 statt.

Abb 22: Vergleich von Chorion- und Deziduagewebe aus Schwangerschaftsmitte:



Elutionsprofile nach Chromatographie in Chloroform-Aceton 9:1, Gewebeproben aus Schwangerschaftsmitte, inkubiert mit A4 und T:

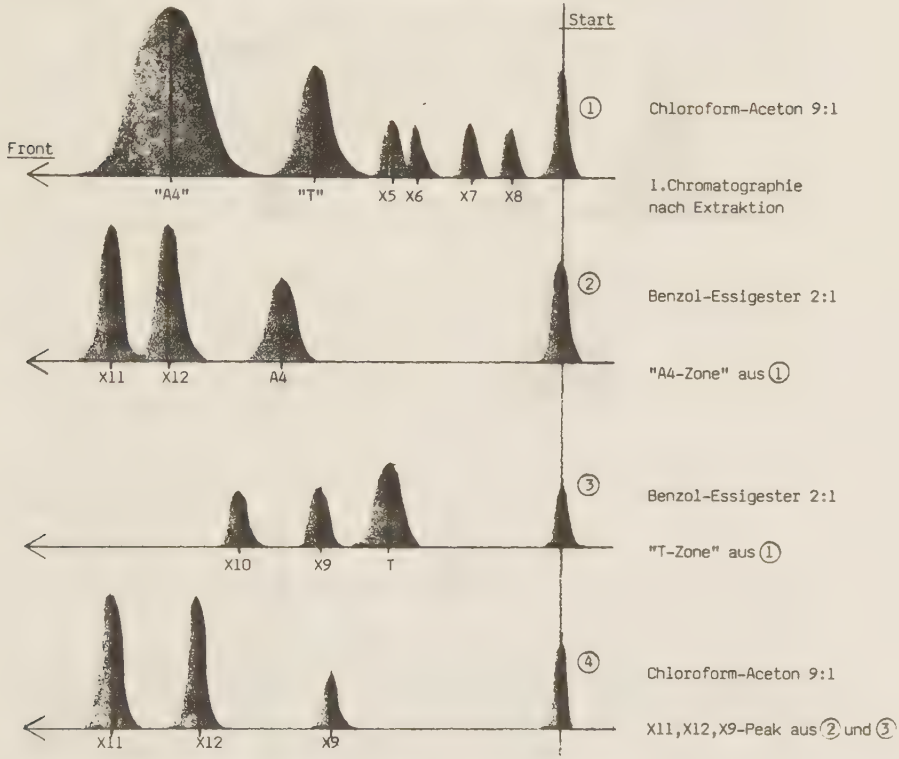
1 = Choriongewebe, inkubiert mit A4.
2 = Deziduagewebe, inkubiert mit A4.
3 = Choriongewebe, inkubiert mit T.
4 = Deziduagewebe, inkubiert mit T.

Ergebnis (aus Abb 22):

Qualitativ war unter den Versuchsbedingungen kein Unterschied zwischen Dezidua- und Eihautinkubationen nach A4- und T-Inkubation feststellbar.

4.14: Placentagewebe, inkubiert mit A4 und T:

Abb 23: Elutionsprofile der Inkubationen von Placentagewebe mit A4:



Bei Inkubation von Placentagewebe mit T ergaben sich Elutionsprofile, die qualitativ nicht von den in Abb 23 dargestellten Profilen unterscheidbar waren.

Abb23/① zeigt die 1. Chromatographie nach der Extraktion. X5 - X8 wurden qualitativ nicht weiter untersucht.

Abb 23/② zeigt die getrennt eluierte und im System Benzol-Essigester 2:1 rechromatographierte "A4-Zone" aus 23/1. Hier trennten sich die Substanzen X11 und X12 ab. X11 ist nicht 5α-Androstandion (negative Kristallisation).

Abb 23/③ zeigt die getrennt eluierte "T-Zone" aus 23/1, chromatographiert im System Benzol-Essigester 2:1. Hier trennten sich X9 und X10 ab. X10 wanderte mit dem Rf-Wert von Östradiol.

Abb 23/④ zeigt die Rechromatographie der Substanzen X9,X10, X11 im System Chloroform-Aceton 9:1.

4.15: Abb 24: Myometriumgewebe, 15.-40.Schwangerschaftswoche, inkubiert mit A4, ohne NADPH- Inkubationszusatz :

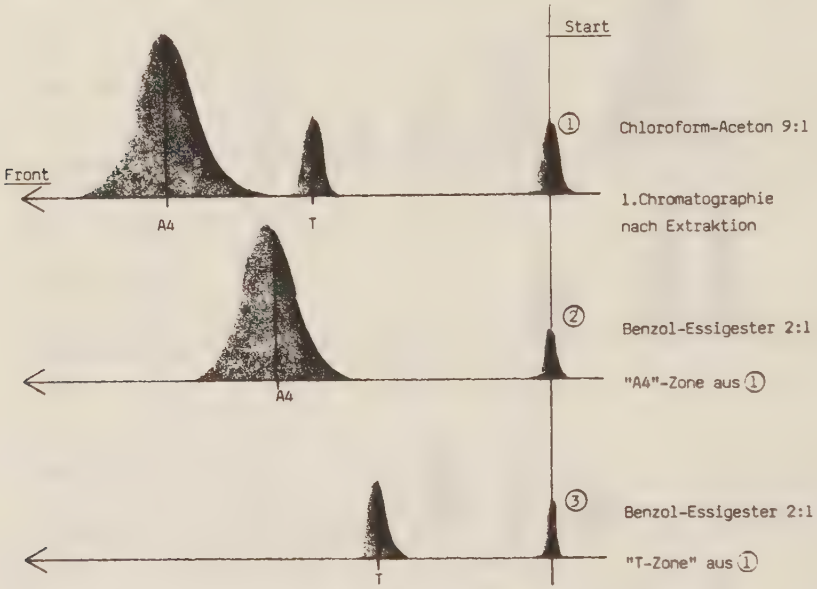


Abb 24/① zeigt die 1. Chromatographie nach Extraktion.

Abb 24/② zeigt die Chromatographie der "A4-Zone" aus 24/1 im System Benzol-Essigester 2:1. Bei den Inkubationen ohne NADPH-Inkubationszusätze trennte sich keine Substanz von der A4-Zone. Bei Inkubationen mit NADPH trennte sich eine Substanz mit dem Rf-Wert von 5α-Androstandion ab.

Abb 24/③ zeigt die Chromatographie der "T-Zone" aus 24/1 im System Benzol-Essigester 2:1. Hier trennte sich keine Substanz von der T-Zone.

Der Hauptumsatz fand in Richtung T statt.

"Zerfall": Als Zerfall wurde angesehen, wenn sich die Rf-Werte von Substanzen von Chromatographie zu Chromatographie änderten. Dies war bei Inkubationen von Amnion-,Chorion-,Dezidua-,Myometriumgewebe nur in unbedeutenden Prozentsätzen der Fall, bei T-Inkubation in größerem Umfang, als bei A4-Inkubation. Bei Placentainkubationen mit A4 und T "zerfielen" bei Rechromatographie bis zu 50% der Peaks X11 und X12 und anderer Substanzen, die in der 1.Chromatographie mit dem Rf-Wert von A4 gewandert waren.

4.16 Kristallisationen - Identifizierung:

Zur Überprüfung der Reinheit des Substrats wurde die inkubierte Substanz A4 kristallisiert. Dazu wurde ein Aliquot der gesammelten A4-Peaks mehrerer Experimente verwendet.

Ml = Mutterlauge, K = Kristall, spezifische Aktivität in cpm/mg

Ml	466	476	459	450	461
K	455	440	432	453	474

Kristallisation des T-Peaks aus den A4-Inkubationen mit Amniongewebe mit 50mg authentichem Testosteron.

Ml = Mutterlauge, K = Kristall, spezifische Aktiviät in cpm/mg

Ml	657	647	635	639
K	640	638	627	622

Die untersuchte Substanz ist Testosteron

Kristallisation des T-Peaks aus den A4-Inkubationen mit Choriongewebe mit 50mg authentischem Testosteron.

Ml = Mutterlauge, K = Kristall, spezifische Aktivität in cpm/mg

Ml	643	650	634	631
K	624	625	622	628

Die untersuchte Substanz ist Testosteron

Kristallisation des A4-Peaks aus den T-Inkubationen mit Amnion- und Choriongewebe mit 50mg authentischem Androstendion.

Ml = Mutterlauge, K = Kristall, spezifische Aktivität in cpm/mg

Ml	517	503	483	474
K	475	482	478	475

Die untersuchte Substanz ist Androstendion

Kristallisation des Peaks X11 aus den A4- und T-Inkubationen mit Placentagewebe mit 50mg authentischem 5αAndrostandion.

Ml = Mutterlauge, K = Kristall, spezifische Aktivität in cpm/mg

Ml	791	581	291	176
K	161	122	?	37

Die untersuchte Substanz ist nicht 5α-Androstandion

D Quantitativer Einfluß verschiedener biologisch vorgegebener Bedingungen auf die Aktivität der 17ß-HSD:

4.17 Kommentar zu Abbildungen und Ergebnissen der quantitativen Auswertung.

%-Umsatz:

Als %-Umsatz wird in allen Abbildungen der Umsatz bezeichnet, der sich bei 200000 cpm inkubierter Menge pro Gramm Gewebemenge ergeben hätte (Umrechnung nach 4.7). Diese Umsatzwerte, zusammen mit den gemessenen Umsatzwerten zu jeder Abbildung sind im Anhang tabellarisch aufgelistet.

Standardabweichungen (SD):

Die Standardabweichungen (SD) der Einzel- und Mehrfachbestimmungen innerhalb eines Experiments (gekennzeichnet durch n=1,...n=x) wurden nach Abschnitt 4.6 bis 4.8 berechnet. Wenn Mehrfachbestimmungen vorlagen, wurde der Standardfehler des Mittelwerts verwendet.

Die Standardabweichung bei Zusammenfassung der Werte mehrrer Experimente (gekennzeichnet durch N=1,..... N=x) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$SD = \pm \sqrt{\frac{\sum x^2 - (\sum x)^2 / N}{N - 1}}$$

x = Einzelwert
N = Anzahl der Einzelwerte (=Anzahl der Experimente, je ein Wert je Experiment).

Dabei wurde pro Experiment ein Wert verwendet, bei Mehrfachbestimmungen innerhalb eines Experiments der arithmetische Mittelwert.
Auch bei geringer Anzahl der Experimente (z.B. N=5) wird in der Auswertung die Standardabweichung angegeben, da kein besseres Maß zur Beurteilung von Wertegruppen zur Verfügung steht.

"Extremwerte":

Bei den 17 Inkubationsexperimenten fielen eine Gewebeprobe von Amnion und ein Probe von Chorion durch außerordentlich hohen Umsatz auf (Amnion VII und Chorion XII). Da die Umsatzergebnisse nicht einer Gaußschen Zufallsverteilung zugeordnet werden konnten, stand uns keine Methode zur Verfügung zur Beurteilung, ob es sich bei den Werten um Ausreißerwerte handelte. Alle Wertegruppen wurden daher sowohl mit, als auch ohne diese möglichen Extremvarianten berechnet. Alle in den Abbildungen mit * bezeichneten Balken bezeichnen eine Gruppe ohne einen oder beide Werte.

4.18 Oxidation - Reduktion: alle Inkubationsexperimente mit Amnion- und Choriongewebe der 40.SSW:

Fragestellung:

Wie verhält sich unter den Bedingungen der Experimente bei Inkubation von Eihautgewebeproben mit A4 und T der Umsatz A4 -> T (Reduktion) zum Umsatz T -> A4 (Oxidation)? Ist die Stoffwechselaktivität der 17ß-HSD für eineder beiden Reaktionsrichtungen größer, als für die andere?

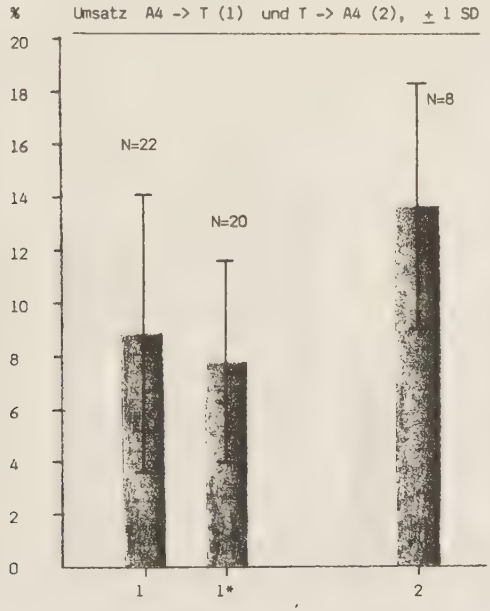


Abb 25: Amnion- und Choriongewebe, inkubiert mit A4 (1) , inkubiert mit T (2).

* = ohne Amnion VII und Chorion XII nach 4.17
Wertetabelle im Anhang

Ergebnis: Bei Inkubation von Amnion- und Choriongewebe zeigte sich unter den Versuchsbedingungen bei der Reaktionsrichtung T -> A4 (Oxidation) eine Tendenz zu größerem %-Umsatz ,als bei der Reaktionsrichtung A4 -> T (Reduktion). (Bei Betrachtung der Ergebnisse ohne die Extremvarianten Amnion VII und Chorion XII wird diese Tendenz deutlicher).

4.19 Oxidation: Amnion - Chorion:

Fragestellung: Sind zwischen Amnion- und Choriongewebe bei Inkubation mit A4 Umsatzdifferenzen nachweisbar ? (Abb 26)

4.20 Reduktion: Amnion - Chorion:

Fragestellung: Sind zwischen Amnion- und Choriongewebe bei Inkubation mit T Umsatzdifferenzen nachweisbar ? (Abb 27)

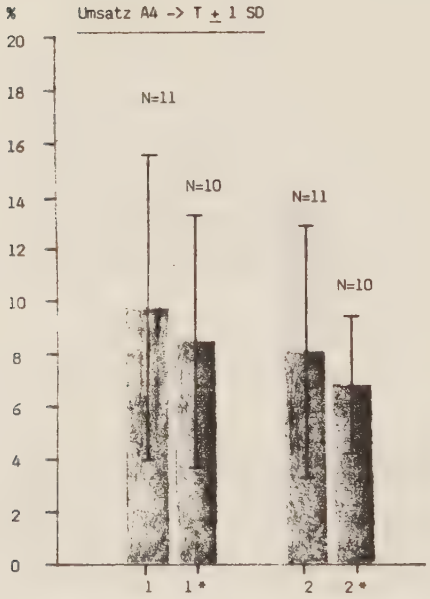


Abb 26: Amnion (1) und Chorion (2), inkubiert mit A4.

* = ohne Amnion VII und Chorion XII nach 4.17
Wertetabelle im Anhang

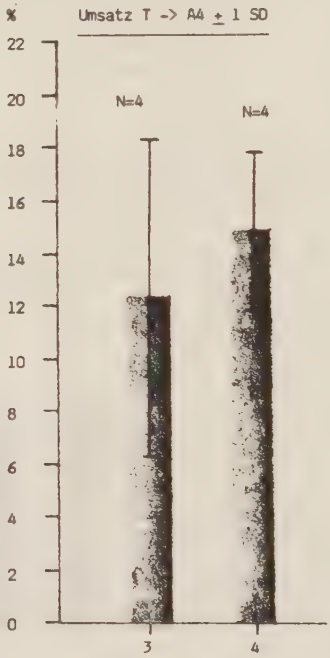


Abb 27: Amnion (3) und Chorion (4), inkubiert mit T.

Wertetabelle im Anhang

Ergebnis 4.19: In Abb 26 ist als schwache Tendenz erkennbar, daß bei den Inkubationen mit Amniongewebe eine größerer Prozentanteil des inkubierten A4 zu T umgesetzt wurde,als bei den Inkubationen mit Choriongewebe.

Ergebnis 4.20: In Abb 27 ist als Tendenz erkennbar, daß bei den Inkubationen mit Amniongewebe ein geringerer Prozentanteil des inkubierten T zu A4 umgesetzt wurde, als bei den Inkubationen mit Choriongewebe.

4.2: Einfluß des Zeitpunkts des Blasensprungs bei A4-Inkubation:

Fragestellung: Sind Umsatzbeträge der 17ß-HSD der Eihäute bei Inkubation mit A4 korrelierbar mit dem Zeitpunkt des Blasensprungs ?

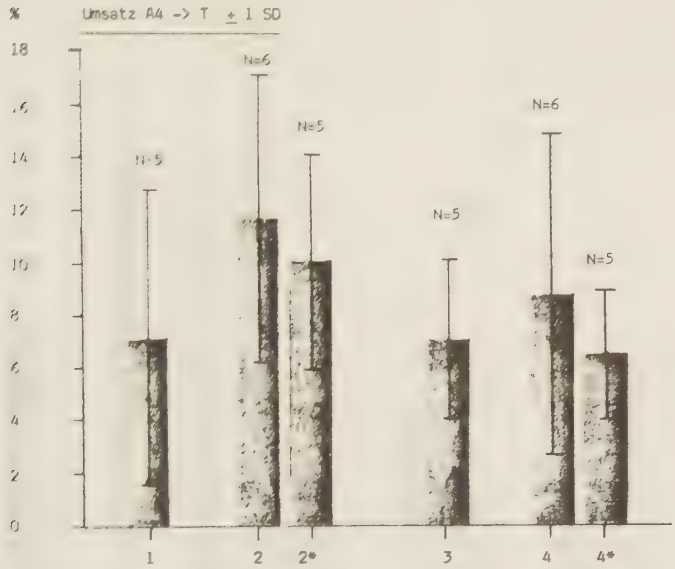


Abb 28: Amnion- und Choriongewebe, inkubiert mit A4:

1 = Amnion, Blasensprung vor oder bei Beginn regelmäßiger Wehentätigkeit.
2 = Amnion, Blasensprung während des Geburtsvorganges oder Blasensprengung.
3 = Chorion, Blasensprung vor oder bei Beginn regelmäßiger Wehentätigkeit.
4 = Chorion, Blasensprung während des Geburtsvorganges oder Blasensprengung.
* = ohne Amnion VII oder Chorion XII nach 4.17

Wertetabelle im Anhang

Ergebnis: Aus Abb 28 geht hervor, daß Amniongewebe von Schwangerschaften mit Blasensprung vor und bei Beginn regelmäßiger Wehentätigkeit unter den Versuchsbedingungen dazu tendierte, weniger A4 umzusetzen, als Amniongewebe von Schwangerschaften mit Blasensprung während des Geburtsvorganges oder Blasensprengung. Durch den Extremwert des Experiments "Amnion VII" wird diese Tendenz verstärkt; sie ist jedoch auch ohne Einbeziehung dieses Werts deutlich sichtbar (mit * gekennzeichneter Balken in Abb 28).
Bei Inkubationen mit Choriongewebe war diese Tende nz nicht erkennbar.

4.22 Einfluß des fetalen Geschlechts auf den Umsatz A4 -> T und T -> A4:

Fragestellung: Ist nach Inkubation von A4 und T unter den Versuchsbedingungen eine Abhängigkeit der Stoffwechselaktivität der 17ß-HSD vom Geschlecht des Feten nachweisbar, d.h. ergeben sich Unterschiede im %-Umsatz ?

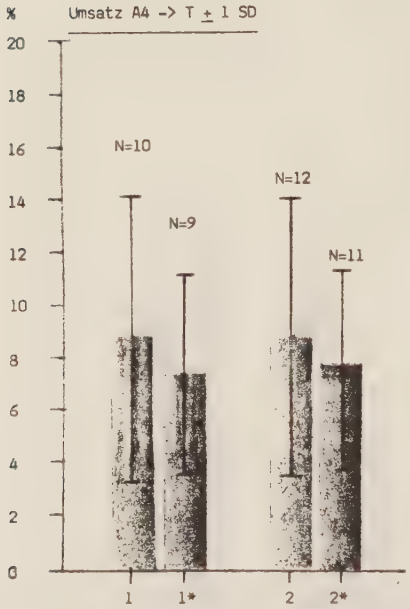


Abb 29: Alle mit A4 inkubierten Eihautproben

1 = weibliche Feten
2 = männliche Feten
* = ohne Amnion VII und Chorion XII nach 4.17

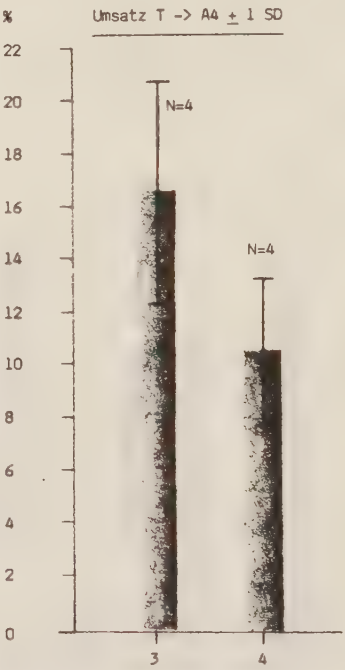


Abb 30: Alle mit T inkubierten Eihautproben

3 = weibliche Feten
4 = männliche Feten
Wertetabellen im Anhang

Ergebnis: Die Resultate bei Inkubation von A4 mit Eihautgewebeproben männlicher und weiblicher Feten zeigten unter den Versuchsbedingungen keine Abhängigkeit des Umsatzes zu T vom Geschlecht des Feten, d.h. der %-Umsatz zu T der Proben männlicher Feten entsprach dem %-Umsatz zu T weiblicher Feten.

Bei T-Inkubation war eine Tendenz erkennbar: Die inkubierten Proben weiblicher Feten oxidierten einen größeren Anteil des inkubierten T, als die Proben männlicher Feten.

4.23 Oxidations- (Abb 31) und Reduktionskapazität (Abb 32) der 17ß-HSD aus Amnion-, Chorion-, Deziduagewebe bei Schwangerschaftsmitte und 40.Schwangerschaftswoche:

Fragestellung: Welche Umsatzraten der 17ß-HSD ergeben sich

- 1. bei Inkubation von Amnion-, Chorion-, Deziduagewebeproben verschiedenen Schwangerschaftsalters mit T ?
- 2. bei Inkubation von Amnion-, Chorion-, Dezidua-,Myometriumproben verschiedenen Schwangerschaftsalters mit A4 ?

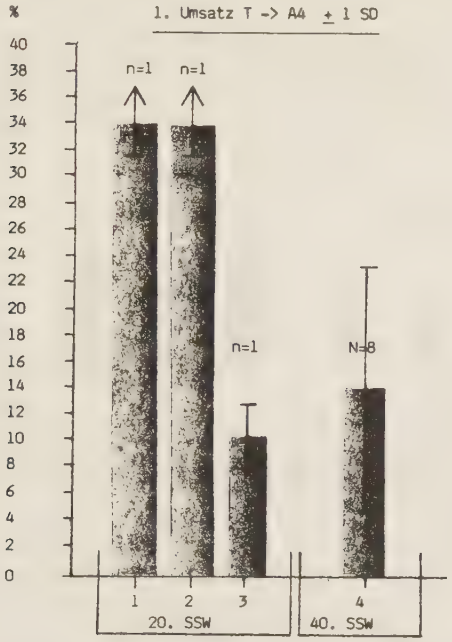


Abb 31: Amnion-, Chorion-, Deziduagewebeproben der 20.-und 40.Schwangerschaftswoche, inkubiert mit T.

1 = Amnion, 2 = Chorion, 3 = Dezidua, 4 = Amnion- und Choriongewebe
Wertetabelle im Anhang

Ergebnis zu 1.: Bei Inkubation mit T oxidierten Amnion- und Choriongewebeproben der 20.SSW unter den Versuchsbedingungen einen deutlich höheren Prozentsatz zu A4, als Amnion- und Chorionproben der 40.SSW.
Deziduagewebe der 20.SSW oxidierte einen etwas geringeren %-Anteil des inkubierten T, als Eihautproben der 40.SSW.
Deziduagewebe der 20.SSW oxidierte einen deutlich geringeren Anteil des inkubierten T zu A4, als Eihautproben der 20.SSW.

2. A4-Inkubation, 15.- bis 40. Schwangerschaftswoche:

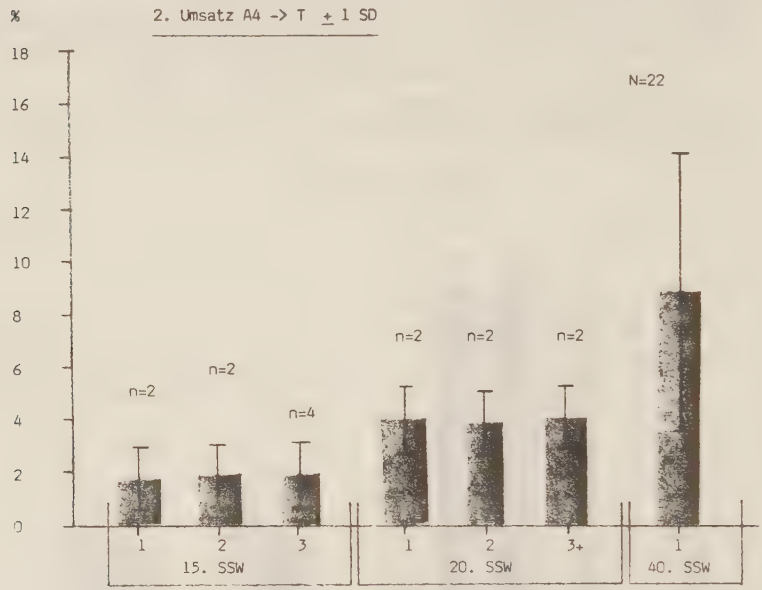


Abb 32: Amnion- und Choriongewebe (1), Dezidua- (2) und Myometriumproben (3) der 15.-,20.-,40. Schwangerschaftswoche, inkubiert mit A4.

+ = NADPH - Inkubationszusatz

Wertetabelle im Anhang

Ergebnis zu 2.: Die Eihaut-, Dezidua- und Myometriuminkubationen der 15. SSW unterschieden sich bei der A4-Reduktion quantitativ kaum und ergaben einen geringeren Umsatz zu T, als die Eihautproben der 20.SSW. Diese wiederum reduzierten weniger A4 zu T, als die Eihautgewebeproben der 40.SSW.
Die Myometriuminkubationen der 20.SSW wurden mit NADPH-Inkubationszusatz durchgeführt und sind daher quantitativ nicht vergleichbar.
Bei der A4-Reduktion durch Deziduagewebe der 15.-20.SSW war kein quantitativer Umsatzunterschied im Vergleich zu den Amnion- und Chorioninkubationen des entsprechenden Schwangerschaftsalters erkennbar.

Gesamtergebnis der Abbildungen 25,31,32:

Bei Inkubation von Deziduaproben aus SS-Mitte und Eihautproben aus SS-Mitte und 40.SSW ergaben sich bei der Oxidation von T größere %-Umsätze, als bei der Reduktion von A4. Bei den Proben aus SS-Mitte war dies deutlicher erkennbar, als bei am Termin gewonnenen Proben.
Die Oxidationskapazität der 17ß-HSD (T->A4) der untersuchten Eihautproben nahm im Lauf der Schwangerschaft deutlich ab, die Reduktionskapazität (A4->T) zu.

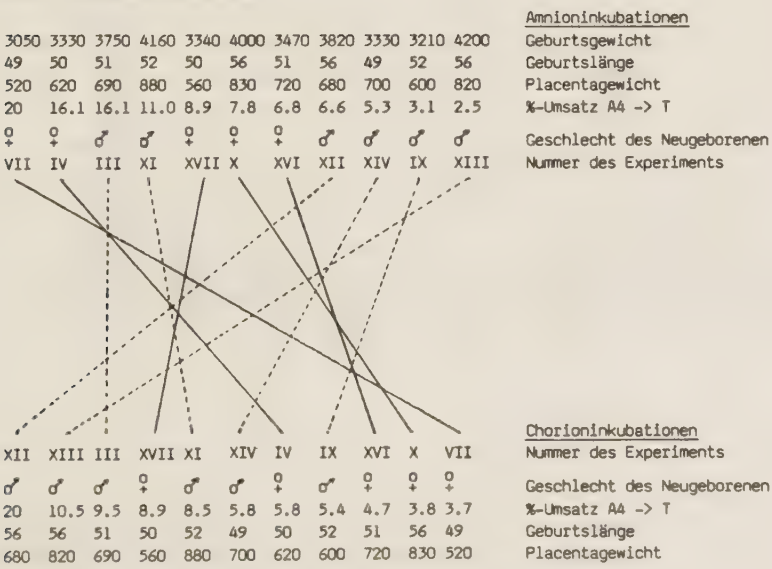
4.24 Korrelationstabelle:

Fragestellung:

Lassen sich Umsatzergebnisse mit dem Geburtsgewicht, der Geburtslänge, dem Placentagewicht, dem Geschlecht des Neugeborenen korrelieren ?

Zur Klärung dieser Fragestellung wurden die Umsätze der untersuchten Amnionproben bei A4-Inkubation und getrennt davon die Umsätze der Chorionproben bei A4-Inkubation der Größe nach geordnet und zu je einer Reihe zusammengestellt. Die beiden Reihen wurden einander gegenübergestellt und die Amnion- und Chorionproben je eines Neugeborenen in Abb 33 durch eine Linie als zusammengehörende Gewebe gekennzeichnet, mit unterbrochener Linie bei männlichem Geschlecht, mit durchgezogener Linie bei weiblichem Geschlecht des Neugeborenen.

Abb 33 :Korrelationstabelle:



Mit Hilfe der Abbildung ist erkennbar, wie groß ein gemessener Umsatzwert einer Gewebeprobe im Vergleich zu den Umsätzen aller Proben des gleichen Gewebes ist, unabhängig von der absoluten Größe des betreffenden Umsatzes: ein Umsatzwert kann in der Gruppe der Chorioninkubationen relativ groß sein, gleichzeitig im Vergleich zu den Amnioninkubationen nur gering, da der Durchschnittsumsatz aller Amnioninkubationen bei A4-Inkubation größer ist, als der Durchschnittsumsatz aller Chorioninkubationen bei A4-Inkubation. Die Abbildung 33 ergibt daher eine Möglichkeit, Relativumsätze zu vergleichen.

Ergebnis:

Bei Geburtsgewicht und Geburtslänge ist keine Korrelation mit Umsatzwerten zu erkennen.

Bei der Spalte des Placentagewichts fällt auf, daß die zur kleinsten Placenta gehörende Amnionprobe den größten Umsatz aller Amnionproben ergab, die entsprechende Chorionprobe den kleinsten Umsatz aller Chorionproben.

Umsatzkorrelation mit dem Geschlecht des Neugeborenen:

Abb 33 zeigt, daß bei weiblichem Geschlecht des Neugeborenen in 4 von 5 Fällen bei A4-Inkubation der Umsatz der Amnionproben zu T relativ höher war, als der Umsatz der Chorionproben des gleichen Neugeborenen zu T.

Bei männlichem Geschlecht des Neugeborenen war in 4 von 6 Fällen der Umsatz der Amnionproben zu T relativ geringer, als der Umsatz der Chorionproben des jeweils gleichen Neugeborenen zu T, in einem von 6 Fällen höher, in einem Fall dem Umsatz der Chorionproben entsprechend.

E Quantitativer Einfluß verschiedener nicht radioaktiv markierter Inkubationszusätze auf die Aktivität der 17ß-HSD:

4.25 Syntocinon ® und Partusisten ® :

Fragestellung: Ergeben sich bei Inkubationsexperimenten mit Syntocinon oder Partusisten als Inkubationszusatz Umsatzdifferenzen im Vergleich zu Inkubationen ohne Zusatz ?

Experimentelles Vorgehen: Bei Exp. VI wurden zwei Vergleichsinkubationen mit Syntocinonzusatz durchgeführt. Da aber die Myometriumproben bei A4-Inkubation ohne NADPH-Zusatz so geringen Umsatz zu T zeigten, daß dieser mit der zur Verfügung stehenden Methode nicht sicher beurteilt werden konnte,konnte nichts über den Einfluß von Syntocinon ausgesagt werden. Daher wurde bei Exp. VII Syntocinon zusammen mit Amnion- und Choriongewebe inkubiert. Dabei stellte sich ein Umsatzunterschied (berechnet für 200000 cpm/g) von 51% bei den Amnionproben und 26% bei den Chorionproben heraus (Bei den gemessenen Werten sogar ein Unterschied von 60% und 33%),im Vergleich zu den Inkubationen ohne Syntocinon. Dieses überraschende Ergebnis führte zu weiteren Experimenten mit Syntocinonzusatz, deren Ergebnisse die Erwartungen jodoch nicht erfüllten.

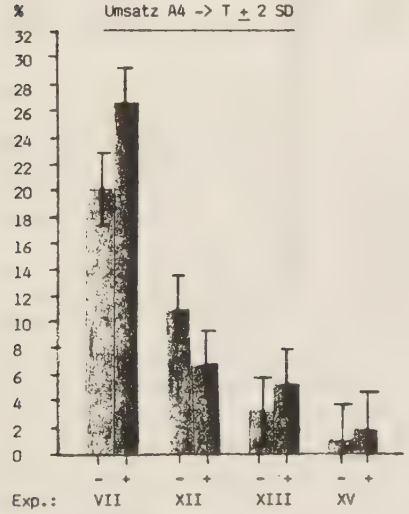


Abb 34: Amniongewebe,inkubiert mit A4.
- = ohne Zusatz, + = Syntocinon-Zusatz.
Wertetabelle im Anhang

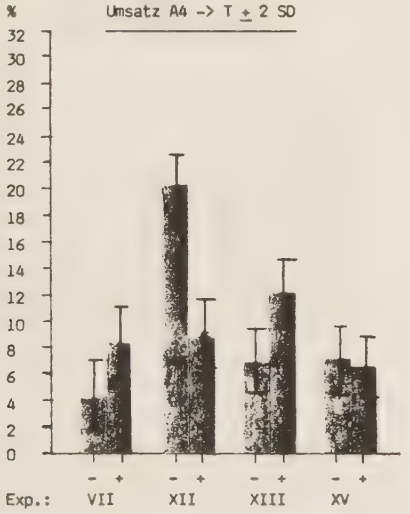


Abb 35: Choriongewebe, inkubiert mit A4.
- = ohne Zusatz, + = Syntocinon-Zusatz.
Wertetabelle im Anhang

Zugesetzte Syntocinonmenge: 30 x 10^{-3} I.E. in 50 µl physiologischer Kochsalzlösung, in 1 ml Puffer (Phosphat-, pH 7.4).

Neben den Experimenten mit A4-Inkubation und Syntocinonzusatz (Abb 34,35,36) wurde ein Experiment mit T-Inkubation und Syntocinon-Zusatz (Abb 37) und ein Experiment mit A4-Inkubation und Partusisten-Zusatz (Abb 38) durchgeführt. Zugesetzte Partusisten-Menge: 20 x 10^{-3} Ampullen = 200 µl in 1 ml Puffer.

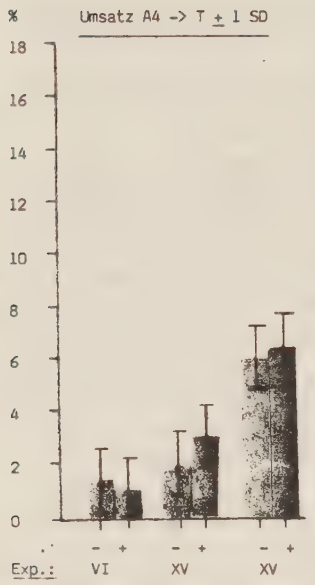


Abb 36: Myometriumproben, inkubiert mit A4

- = ohne Inkubationszusatz
+ = Syntocinon-Zusatz
Wertetabelle im Anhang

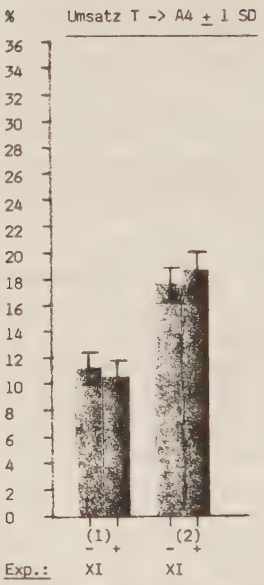


Abb 37: Amnion (1) und Chorion (2), inkubiert mit T

- = ohne Inkubationszusatz
+ = Syntocinonzusatz
Wertetabelle im Anhang

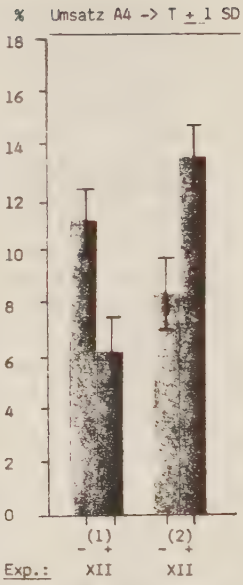


Abb 38: Amnion (1) und Chorion (2), inkubiert mit A4

- = ohne Inkubationszusatz
+ = Partusisten-Zusatz
Wertetabelle im Anhang

Ergebnis: Bei drei von vier Amnion- und Chorioninkubationen überschneiden sich die Bereiche der ± zweifachen Standardabweichungen der %-Umsätze A4 -> T beim Vergleich der Ergebnisse mit und ohne Syntocinon-Zusatz. Bei den Myometriuminkubationen mit A4 überschneiden sich die ± Standardabweichungen der %-Umsätze A4 -> T beim Vergleich der Ergebnisse bei Inkubation mit und ohne Syntocinon-Zusatz. Zusammen mit der Tatsache, daß die %-Umsätze mit Syntocinon-Zusatz sowohl größer, als auch kleiner waren, als ohne Zusatz, ergibt sich die Schlußfolgerung, daß bei A4-Inkubation mit Amnion-,Chorion-,Myometriumgewebe unter den Versuchsbedingungen kein eindeutiger Einfluß der Syntocinon-Inkubationszusätze auf den %-Umsatz A4 -> T nachweisbar war.
Bei Inkubation von Amnion- und Choriongewebe mit T mit und ohne Syntocinon-Zusatz zeigte das durchgeführte Einzelexperiment keinen Syntocinon-Einfluß auf den Umsatz T -> A4.
Die mit Partusisten-Zusatz und A4 inkubierte Amnionprobe zeigte geringeren Umsatz zu T, als die Vergleichsinkubation ohne Zusatz, die Chorioninkubation mit Zusatz zeigte größeren Umsatz zu T, als die Vergleichsinkubation ohne Zusatz. Die Bedeutung dieser Ergebnisse wurde nicht weiter untersucht.

4.26 Einfluß von Progesteron als Inkubationszusatz bei 17-Stunden-Inkubation mit T:

Fragestellung: Wirkt Progesteron als Inkubationszusatz bei T-Inkubation und Inkubationszeiten bis zu 17 Stunden enzyminduzierend ?

Vorgehen: Die in Abb 39 dargestellten vier verschiedenen Inkubationsbedingungen (I - IV) wurden ausgetestet. Alle Proben wurden mit 0.5 µg T inkubiert. Bei zwei Proben wurden 100 µg Progesteron zugesetzt. Bei allen Proben wurden nach 5 Stunden Inkubationszeit 5 ml Puffer und nach insgesamt 14.5 Stunden weitere 2 ml Phosphat-Puffer nachgefüllt. Alle Proben wurden ohne Antibiotika inkubiert, was die Inkubationszeiten beschränkte (Bakterien, pH-Änderung usw.).

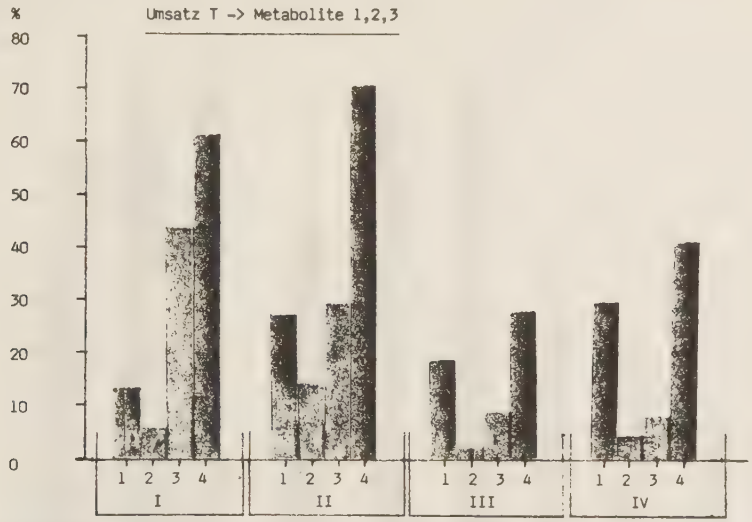


Abb 39: Progesteron als Inkubationszusatz bei 17-Stunden -Inkubationen.

I = (Chorion + T), 17 Stunden inkubiert
II = (Chorion + T + Progesteron), 17 Stunden inkubiert
III = (Chorion), 14.5 Stunden vorinkubiert, anschließend 2.5 Stunden mit T inkubiert
IV = (Chorion + Progesteron),14.5 Stunden vorinkubiert, dann 2.5 Stunden mit T inkubiert
1 = %-Umsatz zu polaren Peaks mit den Rf-Werten 0.08 und 0.14 (Chloroform-Aceton 9:1)
2 = %-Umsatz zu polarem Peak mit dem Rf-Wert 0.24 (Chloroform-Aceton 9:1)
3 = %-Umsatz zu A4
4 = Gesamt-%-Umsatz zu 1 + 2 + 3 Wertetabelle im Anhang

Ergebnis: Alle vier untersuchten Bedingungen (Abb 39: I-IV) führten zu qualitativ gleichen Elutionsprofilen, die sich quantitativ unterschieden (Abb 39). Progesteron als Inkubationszusatz verursachte bei T-Inkubation unter den verschiedenen Versuchsbedingungen eine Abnahme des Umsatzes zu A4, eine Zunahme des Umsatzes zu den nicht identifizierten polaren Peaks und eine Zunahme des Gesamtumsatzes.Dies wurde bei 17-Stunden -Inkubation von T deutlicher, als bei 2.5-Stunden-Inkubation.

4.27 Einfluß von Progesteron bei 2.5-Stunden-Inkubation mit T:

Fragestellung: Beeinflußt Progesteron als Inkubationszusatz bei T-Inkubation den %-Umsatz zu A4 bei Inkubationszeiten von 2.5 Stunden ? Findet Enzyminduktion innerhalb einer Stunde statt?

Vorgehen: Die in Abb 40 dargestellten Inkubationsbedingungen wurden untersucht (Abb 40: 1-5). Dabei wurden Progesteronmengen von 12 µg und 120 µg zugesetzt, bei inkubierten T-Mengen von 0.5 µg. Um festzustellen, ob die 17ß-HSD der Eihäute innerhalb einer Stunde unter den Versuchsbedingungen induziert werden kann, wurde ein Teil der Proben ohne T-Zusatz mit Progesteron eine Stunde bei 37° C vorinkubiert; anschließend wurde mit T weitere 2.5 Stunden inkubiert.

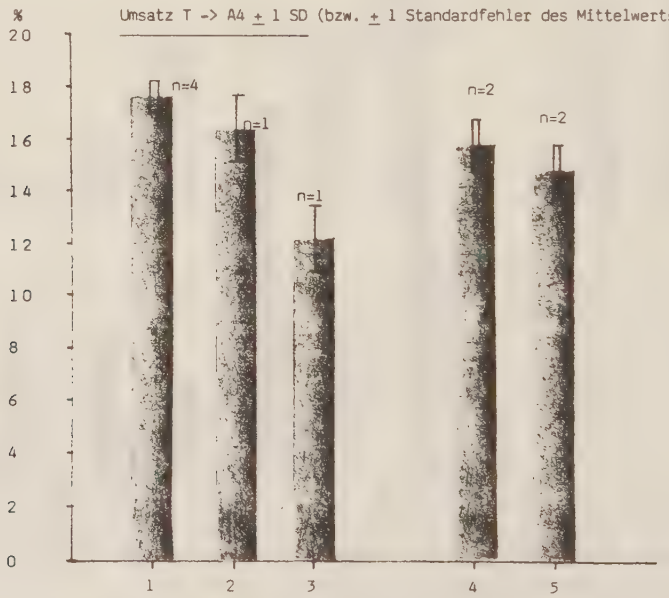


Abb 40: Einfluß von Progesteron bei2.5-Stunden -Inkubationen

1 = (Chorion + T), 2.5 Stunden inkubiert
2 = (Chorion + T + 12 µg Progesteron), 2.5 Stunden inkubiert
3 = (Chorion + T + 120 µg Progesteron), 2.5 Stunden inkubiert
4 = (Chorion), 1 Stunde vorinkubiert, anschließend weitere 2.5 Stunden mit T inkubiert
5 = (Chorion + 12 µg Progesteron), 1 Stunde vorinkubiert, dann 2.5 Stunden mit T inkubiert
Wertetabelle im Anhang

Ergebnis: Eine 25-fache Progesteronmenge im Vergleich zur inkubierten T-Menge hemmte den Umsatz zu A4 um etwa 9%, eine 250-fache Menge um 33 %. Bei 25-facher Progesteronmenge und einer Stunde Vorinkubation ohne Substrat und anschließender 2.5-Stunden-Inkubation mit T war der Umsatz zu A4 um 7% geringer, als bei Inkubation ohne Progesteron-Zusatz.

4.28 Quantitativer Einfluß von Progesteron und Androstendion als Reaktionszusätze bei Inkubation von T:

Fragestellung: Wie wirken sich Androstendion und Progesteron als Inkubationszusätze auf die Reaktion T -> A4 unter den Versuchsbedingungen aus?

Experimentelles Vorgehen: Die verwendeten Chorionproben wurden mit je 0.5µg 14-C-markiertem T 2.5 Stunden inkubiert. Als Inkubationszusätze wurden nicht radioaktiv markiertes A4 und Progesteron verwendet in Mengen von 10µg,100µg,500µg.

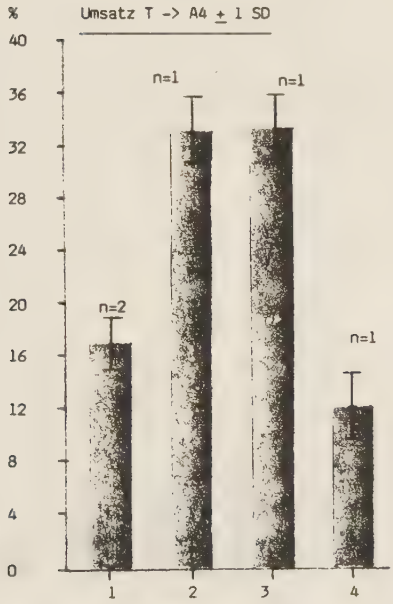


Abb 41: Chorionproben, inkubiert mit je 0.5 µg T.

1 = kein Inkubations-Zusatz
2 = 10µg Androstendion als Inkubations-Z.
3 =100µg Androstendion als Inkubations-Z.
4. =500µg Androstendion als Inkubations-Z.

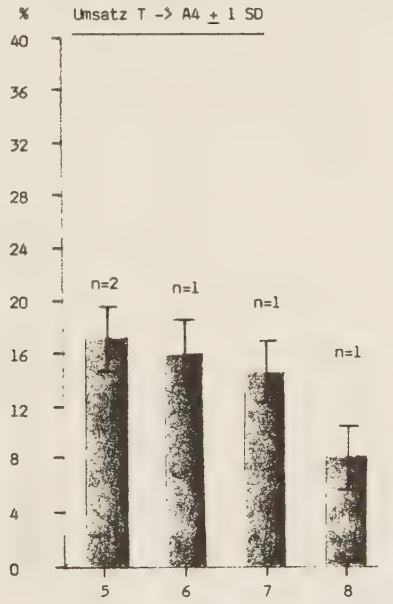


Abb 42: Chorionproben, inkubiert mit je 0.5µg T.

5 = kein Inkubations-Zusatz
6 = 10µg Progesteron als Inkubations-Zusatz
7 = 100µg Progesteron als Inkubations-Zusatz
8 = 500µg Progesteron als Inkubations-Zusatz

Wertetabellen im Anhang

Ergebnis: Unter den Versuchsbedingungen bewirkten 10µg und 100 µg A4 als Reaktionszusatz eine Steigerung des Umsatzes T -> A4, 500µg bewirkten eine Verminderung des Umsatzes. Progesteron als Reaktionszusatz führte bei einer Menge von 10µg zu keiner Umsatzänderung, bei Mengen von 100µg und 500µg zu einer Umsatzverminderung.

4.29 Quantitativer Einfluß von Progesteron und Testosteron als Reaktionszusätze bei Inkubation von A4:

Fragestellung: Wie wirken sich Testosteron und Progesteron als Inkubationszusätze auf die Reaktion A4 -> T unter den Versuchsbedingungen aus?

Experimentelles Vorgehen: Die verwendeten Chorionproben wurden mit 0.5µg 14-C-markiertem A4 2.5 Stunden inkubiert. Als Inkubationszusätze wurden nicht radioaktiv markiertes T und Progesteron verwendet in Mengen von 10µg,100µg,500µg.

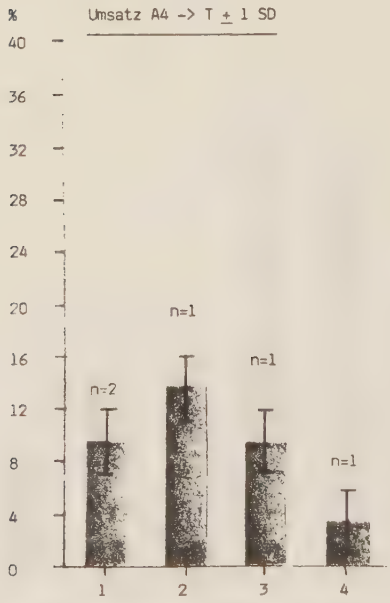


Abb 43: Chorionproben, inkubiert mit je 0.5µg A4:

1 = kein Inkubationszusatz
2 = 10µg Testosteron als Inkubations-Zusatz
3 = 100µg Testosteron als Inkubations-Zusatz
4 = 500µg Testosteron als Inkubations-Zusatz

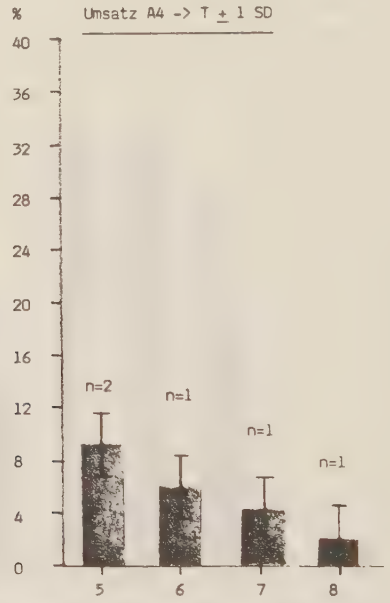


Abb 44: Chorionproben, inkubiert mit je 0.5µg A4:

5 = kein Inkubations-Zusatz
6 = 10µg Progesteron als Inkubations-Zusatz
7 =100µg Progesteron als Inkubations-Zusatz
8 =500µg Progesteron als Inkubations-Zusatz

Wertetabellen im Anhang

Ergebnis: Unter den Versuchsbedingungen bewirkten 10µg T als Reaktionszusatz eine Steigerung des Umsatzes A4 -> T. 100µg T führten zu keiner Umsatzveränderung, 500 µg T zu einer Verminderung des Umsatzes. Progesteron als Reaktionszusatz verminderte den Umsatz A4 -> T bei zugesetzten Mengen von 10µg, 100µg,500µg.

F Quantitative Analyse der Myometrium- und Placentainkubationen, - Gesamtstoffwechselaktivität aller untersuchten Gewebe bei Inkubation von A4 und T:

Unter Gesamtstoffwechselaktivität ist die Gesamtabnahme der Menge der inkubierten Substanz in % zu verstehen, d.h. der Anteil in %, der zu verschiedenen Metaboliten umgesetzt wurde.

4.30 Myometrium, 15.-40.Schwangerschaftswoche, A4-Inkubation:

Fragestellung:

Wieviel Prozent des inkubierten A4 werden durch Myometriumgewebe (Fundus Uteri, Isthmus Uteri) zu T metabolisiert (unter den Versuchsbedingungen)?
Wieviel Prozent des inkubierten A4 werden insgesamt umgesetzt zu T und anderen Metaboliten?

Abb 45: Umsatz A4 -> T und Gesamtumsatz durch Myometriumgewebe:

Experiment	I	II	V	VI	VI	XV
Schwangerschaftswoche	23	23	15	39	39	20
Gewebe	Fundus	Fundus	Fundus	Fundus	Isthmus	Fundus
NADPH als Inkubationszusatz	+					+
n = Anzahl der Mehrfachbestimmungen	2	2	4	3	3	4
Umsatz A4 -> T in %	7	<3	<2	<1.3	<1.2	<4.3
Gesamtumsatz in %	17	<3	<3	<2	<2	<4.3

Ergebnis: Bei Inkubation von Myometriumgewebe mit A4 ohne Inkubationszusätze wurden durchschnittlich weniger als 2% des inkubierten A4 zu T umgesetzt.
Insgesamt wurden weniger als 2.5% des inkubierten A4 zu T und anderen Metaboliten umgesetzt. Bei Inkubation mit NADPH als Inkubationszusatz wurde ein deutlich größerer Anteil des inkubierten A4 umgesetzt.
Zum Vergleich der Gesamtaktivität von Amnion-,Chorion-,Dezidua-,Placenta-,Myometriumgewebe (4.34-4.38) werden nur Experimente ohne Inkubationszusatz herangezogen.

4.31 Placentagewebe der 40.SSW, inkubiert mit A4 und T:

Fragestellung: Wie groß sind die quantitativen Anteile der Metabolite, die bei Inkubation von Placentagewebeproben der 40. Schwangerschaftswoche mit A4 und T entstanden?

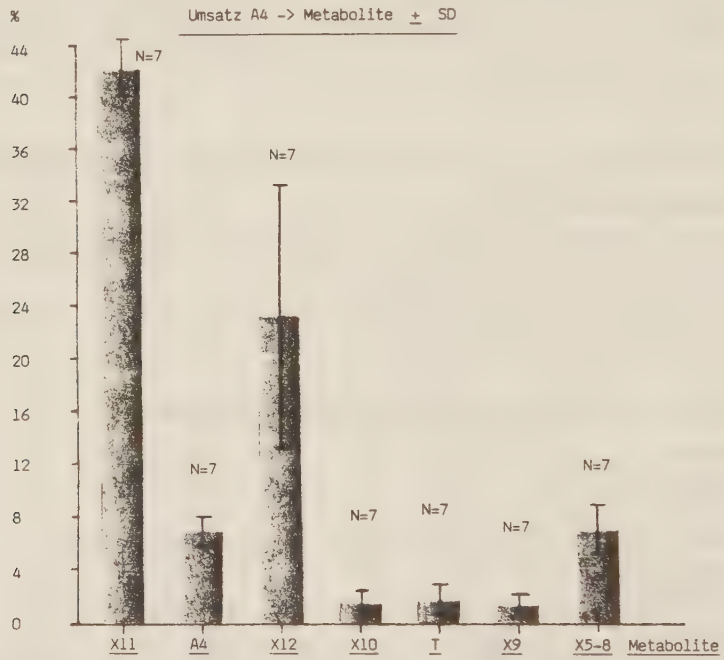
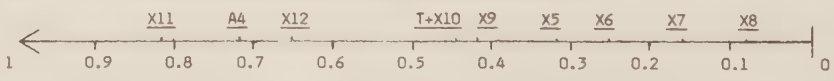
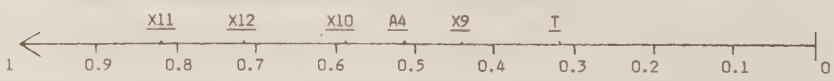


Abb 46: Metabolite nach Inkubation von Placentagewebe der 40.SSW mit A4: Wertetabelle im Anhang

Abb 47: 1.Rf-Werte der Metabolite im System Chloroform-Aceton 9:1



2.Rf-Werte der Metabolite im System Benzol-Essigester 2:1



Ergebnis bei T-Inkubation: Die Rf-Werte der Metabolite bei T-Inkubation entsprechen den oben dargestellten Werten der A4-Inkubationen. Die %-Anteile der Metabolite nach T-Inkubation liegen in den Bereichen der Standardabweichungen der %-Anteile der A4-Inkubationen.

4.32 Placentagewebe aus Schwangerschaftsmitte, inkubiert mit A4 und T:

Fragestellung: In welchem Verhältnis stehen die quantitativen Anteile der Metabolite zueinander, die bei Inkubation von Placentagewebe der 15.-20.SSW mit A4 und T entstanden?

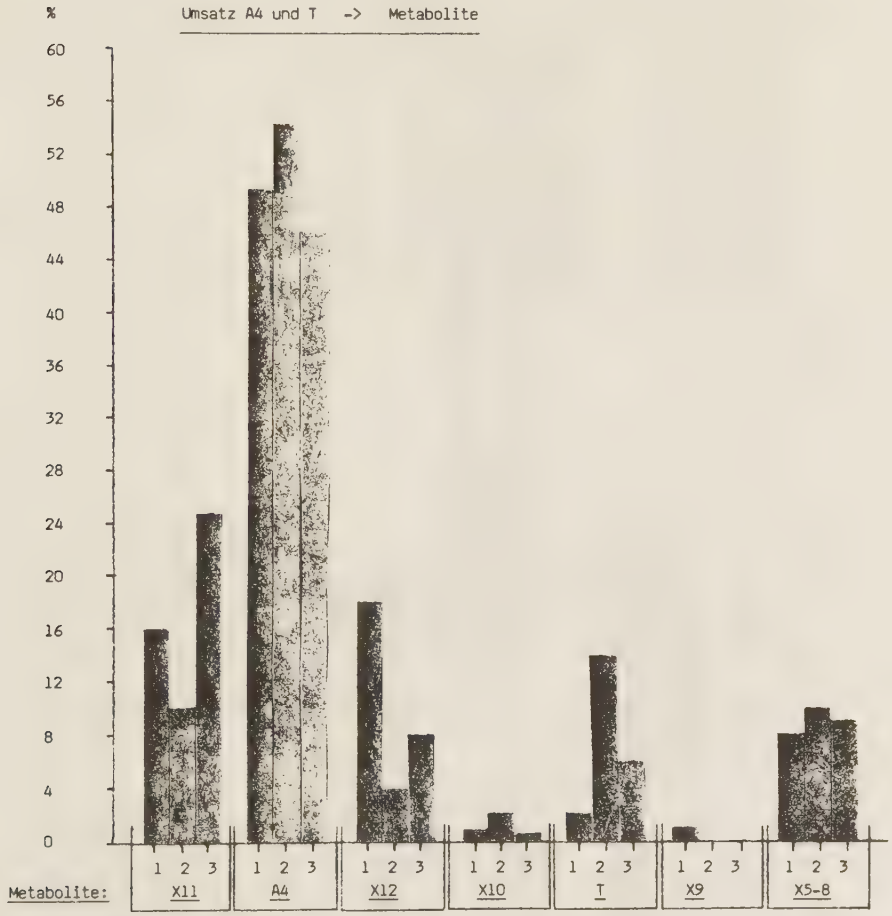


Abb 48: Placentagewebe aus Schwangerschaftsmitte, inkubiert mit A4 und T.
(Rf-Werte der Metabolite: siehe Abb 47)

1 = Placentagewebeproben der 15.SSW, inkubiert mit A4
2 = " der 20.SSW, inkubiert mit A4
3 = " der 20.SSW, inkubiert mit T

Wertetabelle im Anhang

4.33 Prozentanteil von A4 und T als Metabolite bei Inkubation von Placentagewebe aus 15.-40.SSW mit A4 und T:

Fragestellung: Welcher Prozentsatz der inkubierten Substanzen A4 und T wurde bei Inkubation mit Placentagewebeproben verschiedenen Schwangerschaftsalters zu T und A4 metabolisiert, welcher Prozentsatz blieb als A4 und T erhalten?

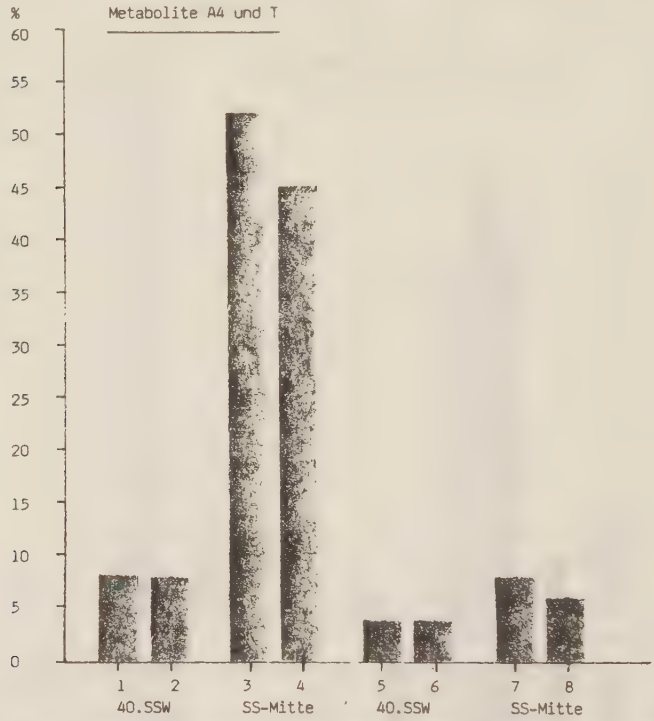


Abb 49:A4 und T als Metabolite bei Placentainkubationen mit Gewebeproben aus Schwangerschaftsmitte und 40.Schwangerschafswoche .

1 = A4 als Metabolit nach A4-Inkubation, 40.SSW
2 = A4 als Metabolit nach T -Inkubation, 40.SSW
3 = A4 als Metabolit nach A4-Inkubation, SS-Mitte
4 = A4 als Metabolit nach T -Inkubation, SS-Mitte
5 = T als Metabolit nach A4-Inkubation, 40.SSW
6 = T als Metabolit nach T -Inkubation, 40.SSW
7 = T als Metabolit nach A4-Inkubation, SS-Mitte
8 = T als Metabolit nach T -Inkubation, SS-Mitte

Wertetabelle im Anhang

Ergebnis: Sowohl nach A4-, als auch nach T-Inkubation war A4 als Metabolit bei Inkubation mit Gewebeproben der 40.SSW in deutlich geringerem Prozentsatz nachweisbar, als bei Inkubation mit Gewebeproben aus Schwangerschaftsmitte. Sowohl nach A4-, als auch nach T-Inkubation war T als Metabolit bei Inkubation mit Proben der 40.SSW in geringerem Prozentsatz nachweisbar, als bei Inkubation mit Proben aus SS-Mitte.

4.34-4.38: Gesamtstoffwechselaktivität der untersuchten Gewebe bei Inkubation von A4 und T:

Fragestellung: Zu welchen Prozentsätzen wurden die inkubierten Substanzen A4 und T in den untersuchten Geweben Amnion, Chorion, Dezidua, Placenta, Myometrium aus Schwangerschaftsmitte und 40. Schwangerschaftswoche unter den Versuchsbedingungen umgesetzt?

Vorgehen: Der Prozentanteil der inkubierten Substanz im Elutionsprofil wird als nicht verstoffwechselter Anteil angesehen und von 100% abgezogen. Dies ergibt den %-Gesamtumsatz (%-Gesamtstoffwechselaktivität).

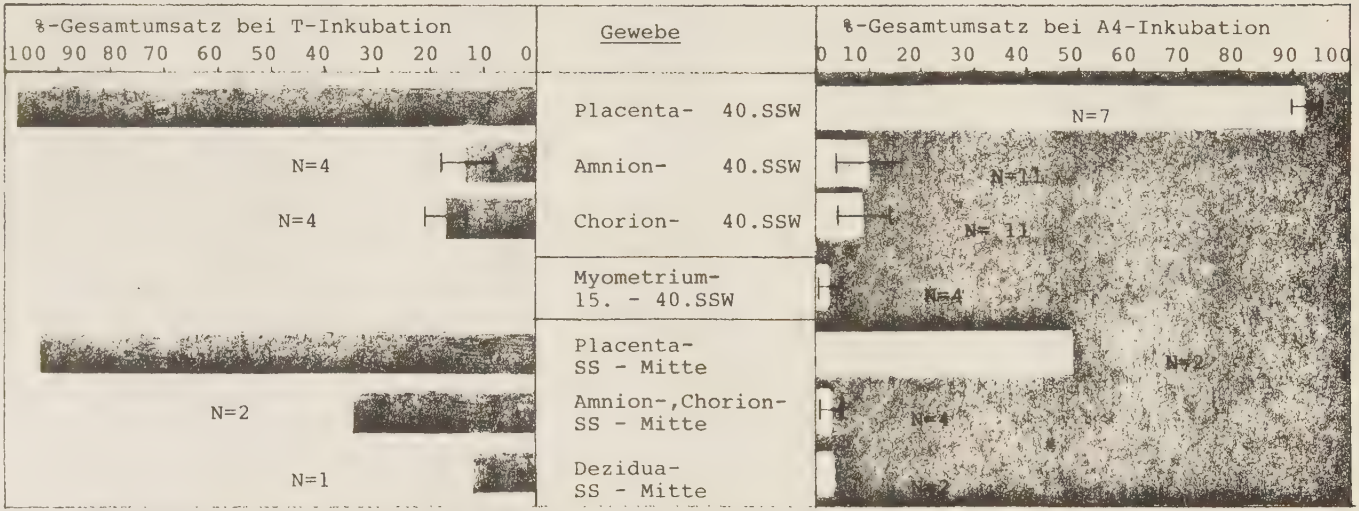


Abb 50: Gesamtstoffwechselaktivität bei A4- und T-Inkubation: Wertetabelle im Anhang

Ergebnisse (Abb 50):

4.34 Gesamtstoffwechselaktivität von Amnion-,Chorion-,Placentagewebe, gewonnen bei Schwangerschaftsende, A4-Inkubation:

Bei Inkubation von Amniongewebe mit A4 wurden durchschnittlich 10 ± 6.1% (Mittelwert ± Standardabweichung) des inkubierten A4 zu verschiedenen Metaboliten umgesetzt, bei Inkubation von Choriongewebe 8.7 ± 4.9%, bei Inkubation von Placentagewebe 93.2 ± 0.7%.

4.35 Gesamtstoffwechselaktivität von Amnion-,Chorion-,Placentagewebe, gewonnen bei Schwangerschaftsende, T-Inkubation:

Amniongewebe setzte durchschnittlich 12.4 ± 5.8% des inkubierten T zu verschiedenen Metaboliten um, Choriongewebe 17.1 ± 0.7%, Placentagewebe 98%.

4.36 Gesamtstoffwechselaktivität von Eihaut-,Dezidua-,Placentagewebe aus Schwangerschaftsmitte, A4-Inkubation:

Die Eihautproben setzten durchschnittlich 3.3 ± 2.5 % des inkubierten A4 um, Deziduagewebe durchschnittlich 3.6%, Placentagewebe 49%.

4.37 Gesamtstoffwechselaktivität von Eihaut-,Dezidua-,Placentagewebe aus Schwangerschaftsmitte, T-Inkubation:

Eihautgewebe setzte durchschnittlich mehr als 34% des inkubierten T um,Deziduagewebe durchschnittlich 10.8%, Placentagewebe 94%.

4.38 Gesamtstoffwechselaktivität von Myometriumgewebe der 15.-40.Schwangerschaftswoche, A4-Inkubation:

Die mit A4 inkubierten Myometriumproben setzten durchschnittlich weniger als 2.5% des inkubierten A4 zu verschiedenen Metaboliten um, wenn keine Inkubationszusätze verwendet wurden.

5 DISKUSSION:

Über den Metabolismus von Androstendion und Testosteron in menschlichem Eihaut- und Deziduagewebe liegen bisher wenige Berichte vor: Makaveeva et al (36) konnten zeigen, daß Amniongewebe der 40. Schwangerschaftswoche eine 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase enthält, die Testosteron metabolisiert, Sulcova et al (64) stellten fest, daß Amnionepithel der 7.-23.SSW eine 17ß-HSD enthält, die Androgene metabolisiert. Untersuchungen mit Deziduagewebe sind uns nicht bekannt. Zahlreiche Autoren führten Inkubationsexperimente mit Placentagewebe durch. Wir untersuchten den Stoffwechsel von Androstendion und Testosteron in den oben genannten Geweben und Myometrium.

1. Bei den Inkubationen von Eihaut- und Deziduagewebe mit Androstendion und Testosteron setzten wir voraus, daß die Substrate in vivo vorhanden sind: Unter der Voraussetzung, daß die untersuchten Steroide die Eihäute durch Diffusion passieren können, zogen wir als Vergleichsmaß für die Substratkonzentrationen in vivo Plasma- und Fruchtwasserkonzentrationen heran. Die Voraussetzung der Diffusion ist nach Katz et al (26), Levitz et al (33), Murphy (44) gegeben.
Nach Gurpide und Holinka (24) beträgt die T-Konzentration im Plasma Schwangerer (3.Trimenon) 100-140ng/100ml, wovon 0.2-0.8ng/100ml nicht an Proteine gebunden sind. Die A4-Konzentration im Plasma der Mutter (3.Trimenon) beträgt nach Rivarola et al (50) durchschnittlich 249ng/100ml, wovon 12.8ng/100ml ungebunden vorliegen. Die folgenden Fruchtwasser-Konzentrationen (2.-3.Trimenon) sind Mittelwerte der von zwölf Autoren veröffentlichten Daten (11,12 18,19,20,21,27,45,47,51,58,70,71): Für T ergibt sich ein Intervall der Fruchtwasserkonzentrationen von 2-110ng/100ml Fruchtwasser, wovon 13% ungebunden vorliegen. Für A4 ergibt sich eine Fruchtwasser-Konzentration von 1-120ng/100ml wovon 30% ungebunden vorliegen. Daraus ergibt sich, daß wir vermutlich eine 1.25×10^3-fache bis 2.5×10^5-fache Menge Substrat im Vergleich zur in den Gewebeproben vorhandenen Steroidmenge inkubierten.
A4 und T können in Eihautgewebe aus Vorstufen synthetisiert werden: Sulcova et al (64,66,67) zeigten, daß Amniongewebe der 7.-23.SSW eine 3ß-HSD/Δ 5-4 Isomerase enthält, die A4 aus DHEA bilden kann. DHEA ist im Fruchtwasser vorhanden (Schindler et al (59)).
In Amnion- und Choriongewebe entstehen A4 und T außerdem durch Hydrolyse von Steroidsulfaten (Steroidkonjugation mit Schwefelsäure findet nicht statt)(26).

Wir fanden, daß die Substrate bei Inkubation mit Amnion- und Choriongewebe der 40.Woche und Amnion-,Chorion-,Deziduagewebe der 15.-20.Woche vor allem durch eine 17ß-HSD metabolisiert wurden, Androstendion zu Testosteron, Testosteron zu Androstendion. Die Substratmenge war nach Inkubation jeweils wesentlich größer, als die Produktmenge, d.h., nur ein geringer Anteil des Substrats wurde metabolisiert (d.h., Gleichgewichtsmechanismen kamen nicht zur Wirkung). Andere Metabolite, als A4 und T entstanden in kaum nachweisbaren Mengen. Dies bedeutet, daß A4 und T in Eihautgewebe der 15.-40.Woche und Deziduagewebe der 15.-20.Woche wahrscheinlich nicht Vorstufen der Östrogensynthese sind.

2. Im Gegensatz dazu werden Androgene in Placentagewebe zu Östron und Östradiol metabolisiert (14,15,17,38,49,53-57 uva). DHEA-Sulfat von Mutter und Fet werden in der Placenta zu A4 und T verstoffwechselt (6,43). Placentagewebe hydrolysiert Steroidsulfate (8,30), Konjugation von Steroiden findet kaum statt (30). Ryan (57) vermutete, daß Steroide die Placenta kaum passieren können, ohne dabei metabolisiert zu werden. Unsere Ergebnisse bestätigen dies für A4 und T: Nur ein geringer Anteil des inkubierten Substrats wurde nicht metabolisiert. Die Metabolite nach A4- und T-Inkubationen mit Placentagewebe der 15.-40.SSW wanderten mit den gleichen Rf-Werten. Sie wurden nicht identifiziert. Daß nach A4-Inkubation die gleichen Metabolite entstanden, wie nach T-Inkubation, ist mit den Ergebnissen vieler Autoren vereinbar, die zeigten, daß in Placentagewebe ein Gleichgewicht zwischen den Reaktionen vieler Enzyme besteht: Die für die Androgenmetabolisation notwendigen 3ß-ol-Dehydrogenasen, Δ 5-4 Isomerasen (DHEA -> A4), verschiedene andere Dehydrogenasen (z.B. die 17ß-HSD: A4 -> T)und eine für C-19-Steroide sehr aktive Aromatase (-> Östrogene) sind in großer Menge vorhanden (23). Die Metabolisation der Substrate durch Placentagewebe unterschied sich deutlich von der Metabolisation durch Eihaut-, Dezidua-, Myometriumgewebe.

3. Bei den Inkubationen von Myometriumgewebe mit A4 konnte eine Reduktion zu T nachgewiesen werden. Die Enzymaktivität war ähnlich wie in Amnion-,Chorion- und Deziduagewebe. Eine 5α-Reduktion konnte ohne Kofaktoren als Inkubationszusätze nicht nachgewiesen werden. Frühere Ergebnisse, die mit der gleichen Methode erzielt wurden (Poschinger), zeigten, daß Myometrium eine 5α-Reduktase enthält. Der Nachweis gelang nur mit NADPH als Inkubationszusatz.

4. Im Fruchtwasser konnten sowohl A4, als auch T von vielen Autoren nachgewiesen werden. Schindler zitierte, daß das Fruchtwasser zu Beginn der Schwangerschaft vom Amnionepithel gebildet wird, daß seine DHEA-Konzentration sich im Lauf der Schwangerschaft der des Neugeborenenurins nähert und schloß daraus, daß Steroidkonzentrationen im Fruchtwasser gegen Schwangerschaftsende vor allem durch den fetalen Urin bestimmt werden (59).

Ein Austausch von Steroiden ist möglich zwischen Fruchtwasser und mütterlichem Kreislauf (Permeabilität der Eihäute (26,33)), zwischen Fruchtwasser und fetaler Haut (16,59) und fetalem Magen-Darm-Trakt (10). Shanies et al (62) veröffentlichten 1972 Ergebnisse über Inkubationen von Zellen aus dem Fruchtwasser mit T. Sie stellten fest, daß Metabolisation vor allem über den 17ß-Reaktionsweg stattfand. Sie hielten die inkubierten Zellen für Fibroblasten des Feten.

5. Im fetalen Kompartiment wurden A4 und T von vielen Autoren nachgewiesen. Androgene können vom Feten aus Gestagenen gebildet werden (17). Steroide werden vor allem mit Schwefelsäure konjugiert, Steroidsulfate kaum gespalten (4,5,17). Die fetalen Nebennierenrinden synthetisieren C-19-Steroide aus Acetat, Cholesterol und Gestagenen (7,22,23). Δ^5-C-19-Steroide (DHEA) werden gegenüber Δ^4-C-19-Steroiden (A4,T) bevorzugt gebildet (23). Der fetale Hoden kann verschiedene C-19-Steroide bilden, bevorzugt T (23). Die fetalen Ovarien können C-19-Steroide bilden aus Preg-

nenolonsulfat. T und Östradiol konnten in den Ovarien nachgewiesen werden (23,48). Die fetale Leber bildet Östriolvorstufen (35). Außerdem enthält sie eine Aromatase für 3-Keto- Steroide (37) und verschiedene Reduktasen für C-19-Steroide (23).

6. Auch im mütterlichen Kompartiment und in der Nabelschnur wurden A4 und T nachgewiesen: Gandy stellte eigene- und Daten verschiedener Autoren zusammen über A4- und T-Konzentrationen in verschiedenen Kompartimenten (23). Hieraus geht hervor, daß die Konzentrationen von A4 und T im Lauf der Schwangerschaft im mütterlichen Kompartiment zunehmen, in der Umbilicalvene höher sind, als in der Umbilicalarterie, jedoch in beiden niedriger, als im Plasma der Mutter und im Plasma der Mutter wenige Tage nach der Geburt den Konzentrationen Nicht-Schwangerer entsprechen. Für die T-Zunahme ist nach Rivarola et al (50) die Zunahme eines speziellen Bindungsproteins verantwortlich, d.h., die Produktionsrate bleibt konstant, ebenso wie die Konzentration des ungebundenen T-Anteils. Da A4 nur an Albumin gebunden wird, dessen Konzentration nicht zunimmt, ist die Zunahme der gebundenen und ungebundenen A4-Menge in der Schwangerschaft nicht erklärbar. Bamman et al (3) zogen aus ihren Ergebnissen den Schluß, daß die T-Produktionsrate nur bis zur 28. SSW konstant bleibt, danach aus bisher nicht geklärter Ursache zunimmt.

Als Abbaumechanismen für Androgene wurden Reduktionsvorgänge beschrieben (17,23), neben Konjugationsvorgängen. Für Androstendion könnte die 5α-Reduktion das erste Glied einer derartigen Reduktionskette sein, 5α-Reduktion konnte aber ohne Kofaktorenzusatz in den Geweben Amnion, Chorion, Dezidua von uns nicht nachgewiesen werden.
Geringe Veränderungen der Androgene können die biologische Potenz deutlich beeinflussen. So könnte Androstendion als partiell inaktiviertes Testosteron angesehen werden, da seine relative androgen-wirksame Potenz nach Gandy (23) etwa 10-20% der Potenz von T entspricht.- Die Bildung von A4 aus T konnte in den von uns untersuchten Geweben nachgewiesen werden.
(Über die Möglichkeit der Inaktivierung der biologischen Wirkung der Androgene durch Bindung an Proteine in Eihautgewebe konnten keine Daten gefunden werden, ebenso wie über Rezeptorenkonzentrationen. (Bindungsproteine in mütterlichem Plasma und Fruchtwasser sind bekannt (50,71)).).
Ein Teil der bei der Extraktion verlorenen Substanzen könnten polare Verbindungen gewesen sein (Steroidsulfate, -Glycosiduronate). Dieser Anteil liegt im Bereich weniger %. Daher kann die Konjugation nicht als wahrscheinlicher Mechanismus angesehen werden, der in Eihautgewebe die biologische Androgenwirkung verändert. Dies entspricht Veröffentlichung von Katz et al (26). Sie beschrieben, daß fetale Gewebe Androgene vor allem mit Schwefelsäure konjugieren, Placentagewebe diese Verbindungen hydrolysiert und die Androgene metabolisiert. Dies ermöglicht ein Zusammenspiel von Placenta, Fet und mütterlichem Kompartiment im Sinne der fetoplacentaren Einheit. So wird z.B. DHEA-Sulfat von Mutter und Fet zur Placenta transportiert, gespalten und zu Östrogenen metabolisiert. Eihautgewebe hydrolysiert ebenfalls bevorzugt, metabolisiert aber deutlich weniger, als Placentagewebe und nimmt daher eine Zwischenstellung zwischen Placenta und fetalen Geweben ein.

Wir suchten nach quantitativen Unterschieden bezüglich des Stoffwechsels von A4 und T in Amnion- im Vergleich zu Chorion-gewebe (1.), beim Vergleich der Reaktionen A4->T und T->A4 (2.), in Abhängigkeit vom Zeitpunkt des Blasensprungs (3.), fetalen Geschlecht (4.), Schwangerschaftsalter (5.).

Um die Ergebnisse quantitativ beurteilen zu können, muß diskutiert werden, wie die Inkubationsbedingungen den Mechanismus der Gleichgewichtsreaktion der 17ß-HSD beeinflussen:
Bei den Amnion-, Chorion-,Dezidüainkubationen mit A4 und T erlaubt der geringe Umsatz der inkubierten Substanzen A4 und T zu anderen Metaboliten, als A4 und T, andere enzymatische Reaktionen, als den 17ß-Reaktionsweg zu vernachlässigen.
Bei den Versuchsbedingungen ist von großen Substratmengen im Vergleich zu den Enzym- und Kofaktorenmengen auszugehen (Daher war der Substrat-Umsatz primär zeitabhängig).
Braselton et al (9) stellten fest, daß die Kofaktorenkonzentration im Homogenat entscheidenden Einfluß auf die Endkonzentrationen von Substraten und Produkten hat. Kofaktoren wurden daher nicht als Inkubationszusätze verwendet. Enzymaktivitäten wurden anhand der Endkonzentrationen von Substraten und Produkten nach gleichen Inkubationszeiten beurteilt. Wenn %-Umsätze in verschiedenen Geweben unter gleichen Inkubationsbedingungen (in gleichen Geweben unter verschiedenen Inkubationsbedingungen), jedoch bei gleichen Inkubationszeiten verschieden groß waren, führten wir dies darauf zurück, daß die untersuchte Reaktion mit unterschiedlicher Intensität, Geschwindigkeit ablief, je nach Enzymaktivität, Kofaktorenausstattung (und Kofaktorenregeneration) in den Gewebeproben. Die relative Größe verschiedener %-Umsätze zueinander konnte unter diesen Bedingungen als Maß für die Aktivität des untersuchten Enzyms in verschiedenen Gewebeproben (oder unter verschiedenen Bedingungen) angesehen werden. Dies trifft nur für die 17ß-HSD in Eihaut-, Dezidua-, Myometriumgewebe zu, nicht aber in Placentagewebe, da Placentagewebeproben über 90% des inkubierten Substrats zu verschiedenen Metaboliten verstoffwechselte.

1. Beim Vergleich von Amnion- mit Chorion**gewebe** konnten wir keine eindeutigen Aktivitätsunterschiede der 17ß-HSD nachweisen, weder für Gewebe der 40.Woche, noch der 15.-20.Woche. Dies ist nicht selbstverständlich, da Amnion und Chorion entwicklungsgeschichtlich verschiedenen Ursprungs sind.

2. Unsere Ergebnisse mit Amnion-,Chorion-, Deziduagewebe der 15.-20.Woche zeigten, daß ein größerer Anteil der inkubierten Substanz T zu A4 umgesetzt wurde, als A4 zu T. Dies entspricht Ergebnissen, die Sulcova et al (64,67) mit Amnionepithel der 7.-23.Woche erzielten. Gewebe der 40.Woche zeigte diesen Unterschied nur als Tendenz. Nach Benagiano et al (5) findet in beinahe allen fetalen Geweben die Reaktionsrichtung T->A4 quantitativ bevorzugt statt gegenüber der Reaktionsrichtung A4->T.
Die biologischen Wirksamkeiten der Androgene A4 und T verhalten sich wie 1:5 (23). Nachdem eine 5α-Reduktion nicht nachgewiesen werden konnte, könnte eine Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten A4 eine Möglichkeit darstellen, die androgene Wirkung von T zu vermindern.

3. Unser Ergebnis, daß Amniongewebe der 40.Woche nach vorzeitigem Blasensprung dazu tendierte, weniger A4 zu T umzusetzen, als Gewebe mit rechtzeitigem Blasensprung oder Sprengung, führte zu der Überlegung, daß der vorzeitige Blasensprung Einfluß auf den Metabolismus haben könnte, oder aber, daß eine primäre Änderung des Metabolismus in Amniongewebe zu vorzeitigem Blasensprung führen könnte. Daß biomechanische Eigenschaften der Eihäute durch enzymatische Aktivität verändert werden können, konnten Artal et al (2) zeigen. Eine Untersuchung dieser Ergebnisse wäre insofern interessant, da bekannt ist, daß in einem bestimmten Zeitintervall nach dem Blasensprung mit großer Wahrscheinlichkeit Wehen in Gang kommen (32,39).

4. Eine Reihe von Autoren versuchte, in verschiedenen Kompartimenten Konzentrationsunterschiede zwischen Schwangerschaften mit weiblichem und männlichem Geschlecht des Feten nachzuweisen. Im mütterlichen Plasma konnten bei Schwangerschaftsmitte unterschiedliche A4- und T-Konzentrationen gemessen werden, nicht aber bei Schwangerschaftsende (28,42,50,58). Bei Schwangerschaftsmitte konnten im mütterlichen Urin unterschiedliche T-Konzentrationen nachgewiesen werden (19). Für Nabelvene und Nabelarterie existieren kontroverse Ergebnisse (11,42,58). Im Fruchtwasser konnten folgende Konzentrationen gemessen werden (11,12,18,19,20,21,27, 45,47,51,58,70,71): Die T-Konzentration ist im gesamten Schwangerschaftsverlauf bei männlichem Geschlecht des Feten größer, als bei weiblichem, bei Schwangerschaftsmitte deutlicher, als am Termin. Die A4-Konzentration ist bei Schwangerschaftsmitte bei männlichem Geschlecht des Feten größer, als bei weiblichem, am Termin bei weiblichem Geschlecht größer, als bei männlichem.
Wir konnten bei A4-Inkubation keine Geschlechtsabhängigkeit des Umsatzes feststellen, bei T-Inkubation, daß Eihautproben weiblicher Feten dazu tendierten, einen größeren Prozentsatz des inkubierten T zu A4 zu oxidieren, als Proben männlicher Feten.
Das bedeutet, daß A4- und T-Konzentrationsunterschiede zwischen männlichen und weiblichen Feten, die im Fruchtwasser bestehen, durch Enzyme des Eihautgewebes nicht ausgeglichen werden. Der Eihautmetabolismus könnte sogar für die A4-Zunahme im Fruchtwasser weiblicher Feten im Lauf der Schwangerschaft mitverantwortlich sein. Sulcova et al (67) konnten bei Gewebe aus 7.-23.Woche keine Geschlechtsunterschiede feststellen, unsere Ergebnisse beziehen sich auf Schwangerschaftsende.

5. Bei Untersuchung von Eihautproben verschiedenen Schwangerschaftsalters stellten wir Folgendes fest:
Der Prozentsatz der inkubierten Substanz A4, der zu T reduziert wurde, nahm vom 2. zum 3.Trimenon zu. Der Prozentsatz der inkubierten Substanz T, der zu A4 oxidiert wurde, nahm vom 2.zum 3. Trimenon deutlich ab, das heißt, die Oxidationskapazität der 17ß-HSD nahm deutlich ab, die Reduktionskapazität zu. Sulcova et al (67 inkubierten Amnionepithel der 7.-23.Woche unter vergleichbaren Versuchsbedingungen mit der gleichen Methode. Aus ihren Ergebnissen geht hervor, daß die Reduktionskapazität der 17ß-HSD im 1. und 2. Trimenon konstant gering ist,die Oxidationskapazität vom 1. zum 2.Trimenon zunimmt zu Werten, die wir im 2. Trimenon fanden. Daher ergibt sich folgender Gesamtverlauf: Die Oxidationskapazität nimmt von ersten zum zweiten Trimenon zu, anschlies-

-send wieder ab, die Reduktionskapazität ist im ersten und zweiten Trimenon gering,nimmt anschließend zu. Eine Zusammenfassung der oben genannten Fruchtwasserkonzentrationen bei männlichem und weiblichem Geschlecht des Feten ergibt, daß die A4-Konzentration vom 2. zum 3.Trimenon etwa konstant bleibt, die T-Konzentation im 1. und 2.Trimenon zunimmt, anschließend wieder abnimmt. Diese Fruchtwasserkonzentrationen korrelieren mit Änderungen der Oxidations- und Reduktionskapazität der 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase im Laufe der Schwangerschaft. Das könnte für eine Induktion der 17ß-HSD durch A4 und T sprechen, aber auch für eine Beeinflussung der Fruchtwasserkonzentrationen durch den Eihautmetabolismus. Wenn durch die Aktivität der 17ß-HSD der Eihäute sekundär die Fruchtwasserkonzentrationen von A4 und T reguliert würden, müßte gegen Schwangerschaftsende aufgrund abnehmender Oxidation, zunehmender Reduktion A4 gegenüber T im Fruchtwasser zunehmen. Das Verhältnis der Fruchtwasser-Konzentrationen von A4 und T beträgt bei Schwangerschaftsmitte3:1, bei Schwangerschaftsende 4.5:1 (berechnet aus Daten von Nagamani et al (45)). Dies spricht dafür, daß das Verhältnis der Konzentrationen von A4 und T im Fruchtwasser durch die 17ß-HSD der Eihäute beeinflußt, vielleicht kontrolliert wird.
Schwarz et al (61) postulierten ein Modell, das über Lysosomendestabilisierung und Bildung von Prostaglandinen aus Arachidonsäure die Weheninitiierung ableitet und bei dem die Eihäute eine zentrale Stellung einnehmen. Die deutliche Abnahme der Oxidation von Schwangerschaftsmitte bis zum Termin könnte zur Zunahme von Substanzen in Eihautgewebe führen, die Lysosomen destabilisieren können (z.B. T oder Östradiol).

Wir untersuchten, ob Reaktionszusätze die Aktivität der 17ß-HSD beeinflussen: -Syntocinon® -Progesteron, -Androstendion,Testosteron,Progesteron:

Bei Verwendung von Syntocinon® als Inkubationszusatz bei Inkubation von Amnion-, Chorion-, Myometriumgewebe mit A4 konnte kein Einfluß des Zusatzes auf den Umsatz A4->T nachgewiesen werden.

Jütting (25) konnte zeigen, daß die 17ß-HSD in Kaninchenmyometrium östrogenspezifisch induzierbar ist. Tseng und Gurpide (68,69) beschrieben, daß die Östradiol-17ß-HSD in menschlichem Endometrium durch Progesteron induzierbar ist, nicht aber durch Östradiol und Östron. In-vivo-Konzentrationen (20ng/ml) waren bereits wirksam. Maximale Induktion wurde durch Konzentationen von 0.25 µg/ml erreicht.
Wir verwendeten Progesteron-Konzentrationen von 12-120µg pro Gramm Gewebe. Nach Milewich et al (40,41) liegt die Progesteron-Konzentration in Eihautgewebe umgerechnet bei 6×10^{-3} µg pro Gramm Gewebe (20.-40.Woche etwa konstant). Das heißt, daß die von uns verwendeten Progesteron-Konzentrationen im Vergleich zu den Gewebekonzentrationen und im Vergleich zu den Konzentrationen der inkubierten Substanz T (0.5µg/Gramm Gewebe) sehr groß waren. Bei 2.5-Stunden- und 17-Stunden-Inkubation konnte keine Induktion gezeigt werden: Bei 2.5-Stunden-Inkubation war keine Induktion zu erwarten. Der gemessene geringere Umsatz T->A4 bei Verwendung von Progesteron als Zusatz gegenüber Inkubation ohne Zusatz muß als Hemmung der Reaktion -durch welchen Mechanismus auch immer- angesehen werden. Wenn bei 17-Stunden-Inkubation eine Induktion

stattgefunden hätte, wäre sie nur sichtbar gewesen, wenn sie größer, als die direkte Hemmung der Reaktion gewesen wäre.

Bei 2.5-Stunden-Inkubation von Chorionproben mit T und A4 und den Reaktionszusätzen Androstendion und Testosteron stellten wir Folgendes fest:
Bei T-Inkubation bewirkten zunehmende Mengen von nicht markiertem A4 als Zusatz zunächst eine Steigerung des Umsatzes T->A4, anschließend (große Mengen Zusatz) eine Umstzverminderung.
Bei A4-Inkubation bewirkten zunehmende Mengen von nicht markiertem T als Zusatz zunächst eine Steigerung des Umsatzes A4->T, große Mengen eine Umsatzhemmung.
(Diese Ergebnisse machen zunächst eine Produktaktivierung der 17ß-HSD denkbar, wie sie z.B. von Oshima et al (46) beschrieben wurde. Dies erscheint uns nicht plausibel, da die Ergebnisse durch Interaktion zwischen großer Substratmenge, kleiner Kofaktoren- und Enzymmenge und verschiedenen Mengen des Zusatzes gut erklärbar sind).
Progesteron als Zusatz beeinflußte die Reaktionen folgendermaßen:
Es hemmte den Umsatz A4->T, wobei die zugesetzten Progesteronmengen dem 20-1000 fachen der inkubierten Menge A4 entsprachen.
Progesteron als Zusatz bei T-Inkubation hemmte den Umsatz T->A4.

Dies führte zu der Überlegung, welche Mechanismen über eine Teilnahme von Progesteron am Metabolismus der 17ß-HSD der Androgene denkbar sind, Teilnahme über: -Induktion der 17ß-HSD, -Änderung der Kofaktorenkonzentration, -Enzymananlagerung, -Identität von 17ß-HSD und 20α-HSD, -Kombination aus Enzymanlagerung und Identität:

- Eine Induktion der 17ß-HSD würde keine Umsatzhemmung ergeben, ist außerdem bei 2.5-Stunden-Inkubationszeit unwahrscheinlich.
- Milewich et al (40,41) konnten eine 20α-HSD in Eihautgewebe nachweisen. Der bei dieser Reaktion gebildete oxidierte bzw. reduzierte Kofaktor könnte die Reaktion der 17ß-HSD beeinflussen. Progesteron müßte sich dann wie Androstendion verhalten (Oxidationsmittel wird reduziert) und als Zusatz den Umsatz A4->T steigern, bei großer Progesteronmenge hemmen. Dies war nicht der Fall.
- Progesteron könnte sich direkt an die 17ß-HSD anlagern und das aktive Zentrum des Enzyms hemmen. Außerdem ist zu überlegen, ob eine gleichzeitige Bindung zweier Steroide (z.B. T und Progesteron oder A4 und 20α-DHP) an einem aktiven Zentrum des Enzyms möglich ist, mit anschließender Übertragung des Wasserstoffatoms ohne Beteiligung von Kofaktor, zumindest in der Richtung, in der das Redoxpotential dies erlaubt. Unser Ergebnis, daß die Reduktionskapazität der 17ß-HSD im Lauf der Schwangerschaft zunimmt und das Ergebnis von Milewich et al (40,41), daß die Reduktionskapazität der 20α-HSD gleichzeitig abnimmt, wäre mit dieser Vorstellung vereinbar.
- Schließlich wurde von verschiedenen Autoren vorgeschlagen, daß die Reaktionen der 17ß-HSD und der 20α-HSD am gleichen aktiven Zentrum des gleichen Enzyms stattfinden können (52,63,68).
- Außerdem ist eine Kombination der letzten beiden Vorschläge denkbar: Milewich et al (40,41) stellten fest, daß sich in Eihautgewebe am Termin die Konzentrationen von Progesteron und 20α-Dihydroxy-Progesteron wie 20:1 verhalten. Dies könnte bedeuten, daß 20α-DHP fast ausschließlich oxidiert wird, Progesteron kaum reduziert,daß Progesteron die aktive Stelle einer 17ß-20α-HSD besetzt, dort nicht umgesetzt wird, gleichzeitig aber die Reaktionen T->A4 und A4->T verhindert.

Um den Stoffwechsel verschiedener Gewebe vergleichen zu können, wurde die Gesamtaktivität bei Inkubation von A4 und T bestimmt. Die Bedeutung dieser Gesamtaktivitäten (bezüglich der Substrate A4 und T) muß diskutiert werden im Zusammenhang mit:
- der Gefäßversorgung der untersuchten Gewebe, - der absoluten Masse in vivo (=Volumen), - der Oberfläche der Gewebe, die mit den untersuchten Steroiden in Kontakt kommen kann, - der Zugehörigkeit der Gewebe zu Kompartimenten:

Die Placenta steht durch Gefäße mit dem fetalen und dem mütterlichen Kreislauf in Verbindung, wodurch ein schneller Austausch von Steroiden möglich ist. Dezidua und Myometrium besitzen Gefäße und stehen mit dem mütterlichen Kreislauf in Verbindung. Amnion und Chorion besitzen keine Gefäße (31). Steroidmetabolismus ist nur nach Transport oder Diffusion in die Gewebe möglich. (Die Permeabilität für die untersuchten Steroide ist gegeben (26)).

Die Volumina von Myometrium, Dezidua und Eihäuten können vereinfachend als gleichbedeutend angesehen werden und dem etwa 10-fachen Volumen der Placenta gegenübergestellt werden. Die Annahme, daß Steroidmetabolismus in der feto-placentaren-Einheit vor allem von der Masse der einzelnen Gewebe abhängig ist, zusammen mit der Tatsache, daß die spezifische Enzymaktivität pro Gramm Gewebe in der Placenta viel größer ist, als in den anderen untersuchten Geweben, macht Myometrium-, Dezidua-, Eihautgewebe beinahe bedeutungslos gegenüber Placentagewebe.

Die Amnion-Oberfläche, die nicht Placentagewebe bedeckt, ist größer, als die Amnion-Oberfläche, die Placentagewebe gegenüber dem Fruchtwasser abgrenzt. Dies trifft ebenso für die Dezidua-, Myometrium-, Chorion-laeve-Oberfläche zu. Steroide, die aus dem Fruchtwasser diffundieren, treffenmit größerer Wahrscheinlichkeit auf Amnion, das die Placenta nicht bedeckt (größere Oberfläche), als auf die Placenta bedeckendes Amnion. So kann die Placenta trotz großer Enzymaktivität die Wirkung von Steroiden, die aus dem Fruchtwasser stammen, auf benachbarte Gewebe, wie Dezidua oder Myometrium nicht oder nur wenig beeinflussen.

Steroidpassage zwischen mütterlichem und fetalem Kompartiment ist möglich über Nabelschnur und Placenta, denkbar über fetalen Urin und Fruchtwasser durch Eihäute und Dezidua zu Myometrium und mütterlichem Plasma. A4 und T und andere Steroide könnten dabei als Informationsträger (z.B. die Reife des Feten betreffend) fungieren und über Nabelschnur und Placenta schnell transportiert werden, würden aber weitgehend in der Placenta metabolisiert. Die Passage vom Feten über Fruchtwasser und Eihäute zu Dezidua Myometrium und mütterlichem Plasma dürfte langsamer sein, da sie vor allem durch Diffusion erfolgt, bietet aber den Vorteil, daß die Gewebe (Myometrium, Dezidua) direkt erreicht werden können und dabei die Steroide bei weitem weniger und durch eine geringere Vielfalt von enzymatischen Reaktionen verstoffwechselt ("verbraucht") werden.

Schwarz et al (61) postulierten ein Modell zur Wehenauslösung: Die Eihäute werden dabei als zentraler Faktor angesehen, da 20% ihres Fettgehalts aus Arachidonsäure, der obligaten Vorstufe verschiedener Prostaglandine bestehen (Über die Bedeutung der Arachidonsäure als Prostaglandinvorstufe besteht kein Zweifel (34)). Durch Aktivierung einer Phospholipase in Lysosomen kann Arachidonsäure freigesetzt werden und in Deziduagewebe zu Prostaglandinen metabolisiert werden. Diese können im Myometrium durch Veränderung der Calcium-Bindungsverhältnisse Wehenin Gang bringen. Der einmal gestartete Vorgang würde sich selbst in Gang halten. Der auslösende Vorgang sei die Beeinflussung der Lysosomen. Schwarz et al (61) schlugen lokalen Progesteronentzug durch Synthesestopp oder veränderte Aktivität der 20α-HSD oder 5α-Reduktase oder den plötzlichen Anstieg eines Bindungsproteins für Progesteron als verantwortlich für den Auslösevorgang vor und gaben dem Bindungsprotein die größte Bedeutung. All diese Vorgänge würden sich nur auf Eihäute und Dezidua beziehen und z.B. unabhängig vom Plasma-Progesteron-Spiegel sein. Abel et al (1) veröffentlichten, daß Östradiol-Applikation in sekretorischem Endometrium zu einem Prostaglandinanstieg führte. Schwarz et al (61) berichteten, daß Östrogene Lysosomen destabilisieren können und somit als auslösende Substanzen in Frage kämen.

Da Progesteron die Reaktion der 17ß-HSD in den Eihäuten beeinflußt (eigene Ergebnisse), ist auch eine Beeinflussung des Progesteron-Metabolismus durch die Substrate der 17ß-HSD denkbar. Daher könnten Änderungen des Metabolismus der 17ß-HSD an der Lysosomendestabilisierung beteiligt sein, z.B. die von uns gemessene Abnahme der Oxidation und Zunahme der Reduktion vom 2. zum 3.Trimenon. Ob Testosteron Lysosomen destabilisiert, ist uns nicht bekannt.

6 ZUSAMMENFASSUNG:

Radioaktiv markiertes Androstendion und Testosteron wurden inkubiert mit 161 Homogenaten von Amnion-, Chorion-, Dezidua-, Myometrium-, Placentagewebe aus 15.-40.Schwangerschaftswoche.

QUALITATIVE ANALYSE: Die Gewebe Amnion, Chorion, Myometrium der 15.-40.Woche, Dezidua der 15.-20.Woche entsprachen sich qualitativ bezüglich der Metabolisation der Substrate Androstendion und Testosteron. Die Substrate wurden vor allem durch eine 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase metabolisiert -Androstendion zu Testosteron, Testosteron zu Androstendion- von anderen Enzymen in kaum meßbaren Mengen. Eine 5αReduktase für Androstendion konnte ohne Inkubationszusätze nicht nachgewiesen werden.
Placentagewebe der 15.-40.Woche: Androstendion und Testosteron wurden zu mehreren verschiedenen Metaboliten verstoffwechselt. Die Produkte der Androstendion-Metabolisation entsprachen den Produkten der Testosteron-Metabolisation, die für Placentagewebe oft beschrieben wurden.

QUANTITATIVE ANALYSE: Bei Untersuchung der Proben fand sich eine deutliche Abnahme der Oxidation von Testosteron im Laufe der Schwangerschaft (20.-40.Woche) und eine weniger deutliche Zunahme der Reduktion von Androstendion (15.-40.Woche).
Durch Gewebe aus 15.-20.Woche wurde ein 10-fach größerer Prozentsatz des inkubierten Testosteron zu Androstendion oxidiert, als der Prozentsatz des inkubierten Androstendion, der zu Testosteron reduziert wurde. Bei Gewebe aus 40.Woche war dies nur noch als Tendenz erkennbar.
Eine Abhängigkeit der Metabolisation von Androstendion vom fetalen Geschlecht konnte nicht nachgwiesen werden. Bei Testosteron-Inkubation war eine Tendenz erkennbar: Die Eihautproben weiblicher Feten oxidierten einen größeren Anteil des inkubierten Testosteron, als Proben männlicher Feten. Diese Ergebnisse waren korrelierbar mit Fruchtwasserkonzentrations-Änderungen, die von anderen Autoren beschrieben wurden.
Eine Beeinflussung der Metabolisation von Androstendion und Testosteron durch den Reaktionszusatz Syntocinon® konnte nicht nachgewiesen werden. Dagegen bewirkten bei Testosteron-Inkubation zunehmende Mengen von Androstendion als Reaktionszusatz zunächst eine Verstärkung der Substrat Oxidation, große Mengen Reaktionszusatz eine Hemmung der Substrat-Oxidation. Bei Androstendion-Inkubation bewirkten zunehmende Mengen von Testosteron als Inkubationszusatz zunächst eine Verstärkung der Substrat-Reduktion, große Mengen eine Hemmung der Substrat-Reduktion. Progesteron als Inkubationszusatz bewirkte sowohl bei kleinen, als auch bei großen Progesteronmengen, bei Androstendion-Inkubation eine Hemmung der Androstendion-Reduktion und bei Testosteron-Inkubation eine Hemmung der Testosteron-Oxidation. Diese Ergebnisse ließen darauf schließen, daß sich die Reaktionen der 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase und der 20α-Hydroxysteroid-Dehydrogenase in Eihautgewebe beeinflussen und wurden im Zusammenhang mit einem Wehenmodell von Schwarz et al diskutiert, das eine Beziehung herstellt zwischen metabolischen Vorgängen in Eihautgewebe und der Auslösung von Wehen.

Die GESAMTAKTIVITÄT ALLER UNTERSUCHTEN GEWEBE bezüglich Androstendion- und Testosteron-Inkubation (=mittlerer Gesamtumsatz der inkubierten Substanz zu verschiedenen Metaboliten) wurde diskutiert im Zusammenhang mit der Gefäßversorgung, der Oberfläche, dem Volumen, der Zugehörigkeit zu Kompartimenten der untersuchten Gewebe.

I. Amnion-, Chorion-, Placentagewebe, 40.Woche, Androstendion-Inkubation:
Amniongewebe setzte 10% des inkubierten Androstendion um, Choriongewebe 8.7%, Placentagewebe 93%.

II. Amnion-, Chorion-, Placentagewebe, 40.Woche, Testosteron-Inkubation:
Amniongewebe setzte 12.4% des inkubierten Testosteron um, Choriongewebe 17.1%, Placentagewebe 98%.

III. Eihaut-, Dezidua-, Placentagewebe, 15.-20.Woche, Androstendion-Inkubation:
Die Eihautproben setzten 3.3% des inkubierten Androstendion um, Deziduagewebe 3.6%, Placentagewebe 49%.

IV. Eihaut-, Dezidua-, Placentagewebe, 20.Woche, Testosteron-Inkubation:
Eihautgewebe setzte 34% des inkubierten Testosteron um, Deziduagewebe 10.8%, Placentagewebe 94%.

V. Myometriumgewebe, 15.-40.Woche, Androstendion-Inkubation:
Die Myometriumproben setzten weniger, als 2.5% des inkubierten Androstendion um.

7 ANHANG WERTETABELLEN:

Zu Abschnitt 4.6: Statistik der Ein- und Mehrfachbestimmungen, Abb 11:

Wertepaare der Doppelbestimmungen	Differenzen innerhalb jedes Wertepaares	
1.2/1.2	±0	Gruppe 3
1.5/1.6	-0.1	
1.7/2.1	-0.4	
1.8/2.6	-0.8	
3.6/3.5	+0.1	
4.9/3.5	+1.4	
4.1/4.7	-0.6	
4.8/4.6	+0.2	
4.5/5.5	-1.0	
5.4/5.8	-0.4	
6.0/5.6	+0.4	
5.1/8.5	-3.4	
8.6/5.5	+3.1	Gruppe 2
7.4/7.2	+0.2	
7.2/7.6	-0.4	
6.7/8.2	-1.5	
8.1/8.2	-0.1	
9.3/8.2	+1.1	
9.1/8.6	+0.5	
9.8/9.3	+0.5	
9.9/9.2	+0.7	
10.8/8.5	+2.3	
12.9/12.8	+0.1	
14.5/14.6	-0.1	Gruppe 1
14.6/14.9	-0.3	
16.4/15.4	+1.0	
16.7/15.7	+1.0	
17.9/17.8	+0.1	
18.8/17.2	+1.6	
18.3/17.8	+0.5	
17.9/18.3	-0.4	
18.4/17.8	+0.6	
17.9/18.4	-0.5	
18.3/18.4	-0.1	

Gruppe1: n=12; $\bar{x}$=-0.4; SD=± 1.1;

Gruppe2: n=11; $\bar{x}$=+0.6; SD=± 1.3

Gruppe3: n=11; $\bar{x}$=+0.3; SD=± 0.7

Gesamt 1+2+3 : n=34; $\bar{x}$=+0.2; SD=± 1.1

Vorgezogen: Zu Abschnitt 4.8: Statistik der Umsatzwerte für 200000 cpm/g (umgerechnete Ein- und Mehrfachbestimmungen):

Wertepaare der Doppelbestimmungen, für 200000 cpm/g, nach Abb 13	Differenzen innerhalb jedes Wertepaares	
1.2/1.2	±0	Gruppe 6
1.6/1.7	-0.1	
1.7/2.1	-0.4	
1.8/2.6	-0.8	
3.6/3.5	+0.1	
4.5/3.5	+1.0	
4.0/4.7	-0.7	
4.7/4.6	+0.1	
6.4/6.8	-0.4	
5.4/5.7	-0.3	
6.0/5.6	+0.4	
5.0/7.8	-2.8	
8.0/5.2	+2.8	Gruppe 5
6.5/6.4	+0.1	
7.0/7.4	-0.4	
7.6/9.3	-1.7	
8.0/8.2	-0.2	
9.2/7.9	+1.3	
7.0/6.0	+1.0	
9.8/9.2	+0.6	
9.1/8.6	+0.5	
12.6/9.3	+3.3	
20/19	+1	
16.1/16.0	+0.1	Gruppe 4
14.5/14.4	+0.1	
17.2/15.0	+2.2	
15.8/15.4	+0.4	
17.1/17.6	-0.5	
17.4/15.6	+1.8	
18.0/17.6	+0.4	
17.1/18.0	-0.9	
18.3/17.6	+0.7	
17.1/18.3	-1.2	
18.0/18.3	-0.3	

Gruppe4: n=12; $\bar{x}$=-0.3; SD=±0.9

Gruppe5: n=11; $\bar{x}$=+0.75; SD=±1.4

Gruppe6: n=11; $\bar{x}$=+0.25; SD=±1.0

Gesamt 4+5+6 : n=34; $\bar{x}$=+0.2; SD=±1.2

Zu Abbildung 13: Umrechnungsdiagramm:

Nummer der Wertegruppe in der Abbildung	Gewebe, inkubiert mit:	Masse in Gramm (g)	cpm inkubiert, nach Extraktion gezählt	$\frac{g}{cpm} \times 10^{-6}$	Einzelwerte der Wertegruppen 1-6: gemessener Umsatz in %.	umgerechneter Umsatz für 200000 cpm/g.
1	Amnion	1.50	219300	6.8	26.6	21.5%
	T	0.25	258100	1.0	7.9	21.5%
2	Amnion	1.50	246700	6.1	9.7	9.2%
	A4	0.25	252500	1.0	5.7	9.2%
3	Chorion	1.26	1066300	1.2	6.7	9.2%
	A4	1.24	634000	2.0	5.9	9.2%
4	Amnion	1.23	1096900	1.1	2.3	2.8%
	A4	1.24	555100	2.2	2.6	2.8%
5	Amnion	1.20	89700	13.4	6.7	5.5%
	A4	1.20	173600	6.9	4.6	5.5%
		1.20	180100	6.7	4.8	5.5%
		1.20	267600	4.5	4.9	5.5%
		1.21	357600	3.4	5.5	5.5%
6	Chorion	1.20	252100	4.8	4.7	4.6%
	A4	1.20	19200	62.5	6.3	4.6%

Die Tabelle zu Abschnitt 4.8 (Statistik der Umsatzwerte für 200000 cpm/g) befindet sich auf der vorhergehenden Seite neben der Tabelle zum Abschnitt: Statistik der Ein- und Mehrfachbestimmungen.

Zu Abbildung 14: Puffermenge:

Nummer des Umsatzes in der Abb.	Gewebe	Puffer	%-Homogenat	Einzelbestimmungen gemessener Umsatz in %	Umsatz bei 200000 cpm/g (nach Abb 13)
1	Chorion	Phosphat-	30	5.9	7.9
2	Chorion	Phosphat-	13	5.8	7.5
3	Chorion	Tris-	25	6.1	7.8
4	Amnion	Phosphat-	30	2.6	2.6
5	Amnion	Phosphat-	13	2.3	2.3

Zu Abbildung 15: Einfluß der Vorinkubation:

Nummer des Umsatzes in der Abbildung	Bedingung	Einzelbestimmungen: gemessener Umsatz in %	Einzelbestimmungen: Umsatz bei 200000 cpm/g (nach Abb 13)	Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts*
1		17.9 18.3 18.4 17.8	17.1 18.0 18.3 17.6	$\bar{x}$ = 17.8% (n = 4) s = ± 0.6%
2	1 Stunde vorinkubiert	16.7 15.7	15.8 15.4	$\bar{x}$ = 15.6% (n = 2) s = ± 0.9%

* : Standardfehler des Mittelwerts = Standardabweichung / Wurzel aus n (Standardabweichung = ± 1.2% ,nach 4.8).

Zu Abbildung 16: Einfluß der Inkubationszeit:

Gewebe	Inkubationszeit, Stunden	%-Homogenat	Einzelbestimmungen: gemessener Umsatz in %	Einzelbestimmungen: Umsatz für 200000 cpm/g (nach Abb 13) in %
Amnion	0	30	0	0
Amnion	2	30	2.3	2.3
Amnion	3	30	2.3	2.3
Amnion	3	13	2.6	2.6
Chorion	2	30	8.3	12.2
Chorion	3	30	5.9	7.9
Chorion	3	25	5.8	7.9
Chorion	3	13	6.1	7.8

Zu Abbildung 17,18,19: Einfluß der Inkubationszeit:

Zu Abb 17: Chorion, inkubiert mit T

Inkubationszeit, Stunden	gemessener Umsatz in %	Umsatz bei 200000 cpm/g*
1.5	11	15
2	10.5	14.4
2.5	14.2	20
3	10.6	14

Zu Abb 18: Amnion, inkubiert mit A4

Inkubationszeit, Stunden	gemessener Umsatz in %	Umsatz bei 200000 cpm/g*
1.5	4.4	4.4
2	4.7	4.7
2.5	4.8	4.7
2.5	4.6	4.6
3	5.5	5.2
3	8.6	8.0

Zu Abb 19: Chorion, inkubiert mit A4

Inkubationszeit, Stunden	gemessener Umsatz in %	Umsatz bei 200000 cpm/g*
1.5	6.9	6.5
2	4.6	4.6
2.5	7.4	6.5
2.5	7.2	6.4
3	5.1	5.0
3	8.5	7.8

* : umgerechnet nach Abb 13, Einzelbestimmungen.

Zu Abbildung 25 ff.: Inkubationen mit Amnion- und Choriongewebe der 40.SSW:

n = Anzahl der Inkubationen unter gleichen Bedingungen = Mehrfachbestimmungen
* = umgerechnet nach Abbildung 13

Amnion, inkubiert mit A4:

Experiment	n	gemessener Umsatz in %	Umsatz bei 200000 cpm/g*
III	2	14.5	16.1
IV	2	15.9	16.1
VII	1	30.1	20
IX	1	3.1	3.1
X	1	8.5	7.8
XI	2	9.7	11.0
XII	2	5.0	6.6
XIII	2	2.5	2.5
XIV	3	5.5	5.3
XVI	1	6.9	6.8
XVII	2	7.7	8.9

Chorion, inkubiert mit A4:

Experiment	n	gemessener Umsatz in %	Umsatz bei 200000 cpm/g*
III	2	9.6	9.5
IV	2	5.8	5.8
VII	1	3.7	3.7
IX	1	5.9	5.4
X	1	3.8	3.8
XI	2	7.5	8.5
XII	2	12.9	20
XIII	2	7.1	10.5
XIV	3	6.2	5.8
XVI	1	4.7	4.7
XVII	2	9.6	8.9

Amnion, inkubiert mit T:

XI	1	6.3	7.4
XIV	1	7.9	9.3
XVI	1	11.1	10.9
XVII	1	26.6	20.8

Chorion, inkubiert mit T:

XI	1	9.8	11.1
XIV	1	10.6	14
XVI	1	18.1	17.8
XVII	1	18.0	16.4

Aus den Tabellen ergibt sich:

Wertetabelle zu Abbildung 25: N = Anzahl der Experimente, je ein Wert pro Exp.

Gewebe	inkubiert mit:	N	gemessener Umsatz in % ± 1 SD	Umsatz bei 200000 cpm/g, umgerechnet nach Abb 13, in % ± 1 SD
Amnion- und Chorion-	A4	22	8.5 ± 6.0	8.7 ± 5.2
Amnion- und Chorion, ohne Amnion VII, Chorion XII nach 4.17	A4	20	7.2 ± 3.5	7.5 ± 3.8
Amnion- und Chorion-	T	8	13.6 ± 6.1	13.5 ± 4.6

Wertetabelle zu Abbildung 26: Reduktion:

Gewebe	inkubiert mit:	N	gemessener Umsatz in % ± 1 SD	Umsatz bei 200000 cpm/g nach Abb 13 ,in % ± 1 SD.
Amnion-	A4	11	9.9 ± 7.9	9.5 ± 5.7
Amnion- ohne Exp.VII	A4	10	7.9 ± 4.4	8.4 ± 4.8
Chorion-	A4	11	7.0 ± 2.8	7.9 ± 4.7
Chorion-ohne Exp.XII	A4	10	6.4 ± 2.1	6.7 ± 2.5

Abbildung 27: Oxidation:

Amnion-	T	4	13.0 ± 9.3	12.1 ± 6.0
Chorion	T	4	14.1 ± 4.5	14.8 ± 2.9

N = Anzahl der Experimente, je ein Wert pro Experiment.

Zu Abbildung 28: Einfluß des Blasensprungs:

Gewebe	Zeitpunkt des Blasensprungs	N	gemessener Umsatz in % ± 1 SD	Umsatz bei 200000 cpm/g nach Abb 13 in % ± 1 SD
Amnion	vor oder bei Beginn regelmäßiger Wehen	5	6.8 ± 4.9	7.0 ± 5.5
Amnion	während der Geburt oder Sprengung	6	12.6 ± 9.4	11.6 ± 5.4
Amnion	wie oben, ohne Amnion VII nach 4.17	5	9.0 ± 4.2	9.9 ± 3.9
Chorion	vor oder bei Beginn regelmäßiger Wehen	5	6.5 ± 2.1	7.0 ± 2.9
Chorion	während der Geburt oder Sprengung	6	7.4 ± 3.4	8.6 ± 6.0
Chorion	wie oben, ohne Chorion XII nach 4.17	5	6.3 ± 2.3	6.3 ± 2.3

Blasensprung vor oder bei Beginn regelmäßiger Wehen: Exp. III,IX,X,XIII,XIV
Blasensprung während der Geburt oder Sprengung: Exp. IV,VII,XI,XII,XVI,XVII

N = Anzahl der Experimente, je ein Wert pro Experiment.

Wertetabelle zu Abbildung 29 und 30: Einfluß des fetalen Geschlechts:

Abb	Gewebe	Geschlecht des Neugeborenen	inkubiert mit	N=Anzahl der Exp., je 1 Wert pro Exp.	gemessener Umsatz in % ± 1 SD	Umsatz bei 200000 cpm/g nach Abb 13 in % ± 1 SD
29	Eihaut-	weiblich	A4	10	9.7 ± 8.0	8.7 ± 5.4
	Eihaut- ohne Amnion VII	weiblich	A4	9	7.4 ± 3.8	7.4 ± 3.8
	Eihaut-	männlich	A4	12	7.5 ± 3.6	8.7 ± 5.2
	Eihaut- ohne Chorion XII	männlich	A4	11	7.0 ± 3.4	7.7 ± 4.0
30	Eihaut-	weiblich	T	4	18.5 ± 6.3	16.5 ± 4.1
	Eihaut-	männlich	T	4	8.7 ± 1.9	10.5 ± 2.8

Wertetabelle zu Abbildung 31,32: Schwangerschaftsmitte - Schwangerschaftsende:

Abb	Gewebe	Schwangerschaftswoche	inkubiert mit	n=Anzahl der Einzelwerte innerhalb des Exp.	N=Anzahl der Exp., je 1 Wert pro Exp.	gemessener Umsatz in % ± 1 SD	Umsatz bei 200000 cpm/g nach Abb 13 in % ± 1 SD
31	Amnion	20	T	1	1	20.6	>34
	Chorion	20	T	1	1	25.6	>34
	Dezidua	20	T	1	1	8.4	10.8
	Eihaut-	40	T		8	13.6 ± 6.8	13.5 ± 4.6
32	Eihaut-	15	A4	2	1	1.6	1.6
	Dezidua	15	A4	2	1	1.9	1.9
	Myometrium	15	A4	4	1	1.7	1.7
	Eihaut-	20	A4	2	1	4.0	4.0
	Dezidua	20	A4	2	I	3.7	3.7
	Myometrium	20	A4	2	1	$3.9^{(\text{mit NADPH})}$	$3.9^{(\text{mit NADPH})}$
	Eihaut-	40	A4		22	8.5 ± 6.0	8.7 ± 5.2

Wertetabelle zu Abbildung 34 bis 38 : Einfluß von Inkubationszusätzen:
(Einzelbestimmungen)

Abb	Exp.	Gewebe	Inkubiert mit	Schwangerschaftswoche	ohne Zusatz	Syntocinon-Zusatz	Partusisten-Zusatz	gemessener Umsatz in %	Umsatz bei 200000 cpm/g (nach Abb 13) in %
34	VII	Amnion	A4	40	+			30.1	20
	VII	Amnion	A4	40		+		45	27
	XII	Amnion	A4	40	+			5.0	6.6
	XII	Amnion	A4	40		+		8.0	10.5
	XIII	Amnion	A4	40	+			2.6	2.6
	XIII	Amnion	A4	40		+		4.6	5.4
	XV	Amnion	A4	20	+			1.1	1.1
	XV	Amnion	A4	20		+		2.1	2.1
35	VII	Chorion	A4	40	+			3.7	3.7
	VII	Chorion	A4	40		+		10.1	7.6
	XII	Chorion	A4	40	+			12.9	20
	XII	Chorion	A4	40		+		7.4	9.0
	XIII	Chorion	A4	40	+			5.9	7.9
	XIII	Chorion	A4	40		+		9.1	12.3
	XV	Chorion	A4	20	+			6.8	6.8
	XV	Chorion	A4	20		+		7.4	6.6
36	VI	Myometrium	A4	39	+			1.4	1.4
	VI		A4	39		+		1.2	1.2
	XV	Myometrium	A4	20	+			2.0	2.0
	XV		A4	20		+		2.9	2.9
	XV	Myometrium	A4	20	+			5.7	5.9
	XV		A4	20		+		6.2	6.3
37	XVI	Amnion	T	40	+			11.8	11.3
	XVI	Amnion	T	40		+		11.1	10.9
	XVI	Chorion	T	40	+			18.1	17.8
	XVI	Chorion	T	40		+		18.5	18.5
38	XI	Amnion	A4	40	+			9.7	11.0
	XI	Amnion	A4	40			+	5.8	6.2
	XI	Chorion	A4	40	+			7.5	8.5
	XI	Chorion	A4	40			+	12.1	13.4

Zu Abbildung 39: Progesteron als Inkubationszusatz bei Inkubation von Chorionproben mit T (Einzelbestimmungen)

Inkubationsbedingung	Umsatz zu A4 in %	Umsatz zu Peak mit Rf = 0.24 in %	Umsatz zu Peaks mit Rf = 0.08 und 0.14 ,in %	Gesamt-umsatz in %
17-Stunden-Inkubation mit 14-C-Testosteron	43	6	13	61
17-Stunden-Inkubation mit Progesteron und 14-C-Testosteron	27	14	29	70
14.5-Stunden-Inkubation ohne Substrat, dann 2.5-Stunden-Inkubation mit 14-C-Testosteron	8.7	1.3	18	28
14.5-Stunden-Inkubation mit Progesteron, dann 2.5-Stunden-Inkubation mit 14-C-Testosteron	7.5	3.3	30	41

Wertetabelle zu Abbildung 40: T-Inkubation mit Choriongewebe und Progesteron-Zusatz:

Inkubationszeit: 2.5 Stunden

n=Anzahl der Mehrfachbestimmungen	Progesteron-Reaktionszusatz in µg	Vorinkubationszeit in Stunden	gemessener Umsatz bzw. arithmetisches Mittel der Mehrfachbestimmungen in %	Umsatz bei 200000 cpm/g in % (nach Abb 13) bzw. Umsatzmittelwerte in %
4	0	0	18.1	17.8
1	12	0	16.8	16.2
1	120	0	12.2	12.0
2	0	1	16.2	15.6
2	12	1	14.8	14.5

Wertetabelle zu Abbildung 41 bis 44: Progesteron,Androstendion,Testosteron als Inkubationszusätze bei A4- und T-Inkubation mit Choriongewebe:

Abb	Reaktionszusatz und Menge in µg	inkubierte Substanz	n=Anzahl der Mehrfachbestimmungen	gemessener Umsatz in % bzw. Mittelwert bei Mehrfachbest.	Umsatz bei 200000 cpm/g (nach Abb 13) in % bzw. Umsatzmittelwert bei Mehrfachbestimmungen
41	0	T	2	18.0	16.5
	10µg Androstendion	T	1	38	≈35
	100µg Androstendion	T	1	39	≈35
	500µg Androstendion	T	1	14	12.1
42	0	T	2	18.0	16.5
	10µg Progesteron	T	1	17.3	15.6
	100µg Progesteron	T	1	15.6	14.5
	500µg Progesteron	T	1	8.6	7.9
43	0	A4	2	9.6	8.9
	10µg Testosteron	A4	1	15.5	13.6
	100µg Testosteron	A4	1	8.8	8.4
	500µg Testosteron	A4	1	2.7	2.7
44	0	A4	2	9.6	8.9
	10µg Progesteron	A4	1	6.5	6.2
	100µg Progesteron	A4	1	4.5	4.5
	500µg Progesteron	A4	1	1.0	1.0

Wertetabelle zu Abbildung 46: Placentagewebe der 40.Schwangerschaftswoche, inkubiert mit A4 und T: (Einzelbestimmungen)

Bezeichnung des Metaboliten:	X11	A4	X12	X10	T	X9	X5-8	Zerfall*
gemessener Umsatz in % ± 1 SD	42 ±1.7	6.8 ±0.7	23 ±9.5	1.4 ±0.6	1.7 ±0.8	1.2 ±0.8	6.8 ±1.3	17
N=Anzahl der Exp. je 1 Wert pro Experiment	7	7	7	7	7	7	7	7

* : Prozentanteil von Metaboliten, die zerfielen, d.h. deren Rf-Wert sich von Chromatographie zu Chromatographie änderte.

Wertetabelle zu Abbildung 48: Placentagewebe der 15.- und 20. SSW, inkubiert mit A4 oder T: (Einzelbestimmungen)

Bezeichnung des Metaboliten:	X11	A4	X12	X10	T	X9	X5-8	Zerfall*
gemessener Umsatz in % bei:								
-15.SSW,inkubiert mit A4	16	49	18	1.2	2.2	1.1	8	5
-20.SSW,inkubiert mit T	25	45	7.7	<0.5	6	0	8.8	7
-20.SSW,inkubiert mit A4	10	54	3.8	1.8	14.2	0	9.9	7

* : Zerfall = Prozentanteil von Metaboliten, deren Rf-Wert sich von Chromatographie zu Chromatographie änderte.

Wertetabelle zu Abbildung 49: A4 und T bei Placentainkubationen mit Gewebeproben aus Schwangerschaftsmitte und 40.Schwangerschaftswoche.

SSW	inkubiert mit	Metabolit	%-Anteil des Metaboliten ± 1 SD	N=Anzahl der Experimente, je 1 Wert pro Exp.
40	A4	A4	6.8 ± 0.7	6
40	T	A4	7	1
20	A4	A4	52	2
20	T	A4	45	1
40	A4	T	1.7 ± 0.8	6
40	T	T	2	1
20	A4	T	8	2
20	T	T	6	1

Wertetabelle zu Abbildung 50: Gesamtaktivität der 17β-HSD in den untersuchten Geweben bei Inkubation von A4 und T:

Gewebe	Schwanger-schafts-woche	inku-biert mit	N=Anzahl der Exp.,je 1 Wert pro Exp.	gemessene Gesamtaktivität= Gesamtabnahme der inkubierten Substanz in % ± 1 SD
Placenta	40	T	1	98
Placenta	40	A4	7	93.2 ± 0.7
Amnion	40	T	4	12.4 ± 5.8
Amnion	40	A4	11	10.0 ± 6.1
Chorion	40	T	4	17.1 ± 4.9
Chorion	40	A4	11	8.7 ± 4.9
Myometrium	15-40	A4	4	1.9 ± 0.8
Placenta	15-20	T	1	94
Placenta	15-20	A4	2	49
Amnion und Chorion	15-20	T	2	34
Amnion und Chorion	15-20	A4	4	3.3 ± 2.5
Dezidua	20	T	1	10.8
Dezidua	15-20	A4	2	3.6

8 LITERATURVERZEICHNIS:

1. Abel MH, Baird DT: The effect of 17β-estradiol and progesteron on prostaglandin production by human endometrium maintained in organ cultures. Endocrinology 106(5):1599-1606, 1980
2. Artal R, Burgeson RE, Hobel CJ, Hollister D: An in vitro model for the study of enzymatically mediated biomechanical changes in the chorioamniotic membranes. Am J Obstet Gynecol 133:656, 1979
3. Bamman BL, Coulam CB, Jiang N: Total and free testosterone during pregnancy. Am J Obstet Gynecol 137:293, 1980
4. Beling C: Estrogens. In Fuchs F, Klopper A (eds): Endocrinology of Pregnancy, Second Edition. Harper & Row, 1977, p 76
5. Benagiano G, Kincl FA, Zielske F, Wiqvist N, and Diczfalusy E: Studies on the metabolism of C-19 steroids in the human foeto-placental unit. 2.Metabolism of androstenedione and testosterone in the intact foeto-placental unit. Acta endocr (Kbh) 56:203, 1967
6. Bloch E, and Newman E: comparative placental steroid synthesis. I.Conversion of (7-^{3}H)-dehydroepiandrosterone to (^{3}H)-androst-4-ene-3.17-dione. Endocrinology 79:524, 1966
7. Bloch E: Fetal adrenal cortex: function and steroidogenesis. In McKerns KW (ed):Functions of the Adrenal Cortex. New York, Appleton-Century-Crofts, 1968 p 721
8. Bolté E, Mancuso S, Eriksson G, Wiqvist N, and Diczfalusy E: Studies on the aromatisation of neutral steroids in pregnant women. 2.Aromatisation of dehydroepiandrosterone and of its sulphate administered simultaneously into a uterine artery. Acta endocr (Kbh) 45:560, 1964b
9. Braselton WE, Engel LL, Orr JC: The Flux of Intermediates and Products in Aromatisation of C 19 Steroids by Human Placental Microsomes. Eur J Biochem 48:35-43, 1974
10. Davis ME and Potter EL: Intrauterine respiration of the human foetus. J amer Med Ass 131:1194-1201, 1946
11. Dawood MY, Saxena BB: Testosterone and dihydrotestosterone in maternal and cord blood and in amniotic fluid. Am J Obstet Gynecol 129:37, 1977
12. Dawood MY: Hormones in amniotic fluid. Am J Obstet Gynecol 128:576, 1977
13. Diczfalusy E: Endocrinology of the foetus. Acta obstet gynec scand. 41 Suppl 1:45, 1962
14. Diczfalusy E: The functions of biosynthesis of the placenta. In: Rélatos del 4° Congreso Mundial de Genecologia y Obstetricia, Mar del Plata, Argentina. Editorial Medica Panamericana, Buenos Aires. 1964a
15. Diczfalusy E: Endocrine functions of the human fetoplacental unit. Fed Proc 23:791,1964b
16. Diczfalusy E, Tillinger KG, Wiqvist N, Levitz M, Condon GP and Dancis J: Disposition of intraamniotically administered estriol-16-^{14}C and estrone-16-^{14}C sulfate by women. J clin Endocrin 23:503, 1963
17. Diczfalusy E: Steroid metabolism in the foeto-placental unit. In Pecile A and Finci C (eds):The Foeto-Placental Unit, Amsterdam p 65-109, Exc Medica Foundation, 1969
18. Distler W, Boniver-Ollmann U, Claussen U, Tigges J und Terinde R: Radioimmunologische Bestimmung von Testosteron mit und ohne Chromatographie des Fruchtwassers zur pränatalen Geschlechtsdiagnose. Arch Gynecol 227:7, 1979
19. Dörner G, Stahl F und Baumgarten G: Signifikante Unterschiede im Testosteron- und 11-OHCS-Gehalt des Fruchtwassers zwischen männlichen und weiblichen Föten. Endokrinologie 60(2):285, 1972
20. Doran TA, Wong PY, Allen LC, Falk M: Amniotic fluid testosterone and follicle-stimulating hormone assay in the prenatal determination of fetal sex. Am J Obstet Gynecol 136:309 1980
21. Dvorak P, Hampl R, Macek M, et al: Free dehydroepiandrosterone and testosterone in human amniotic fluid and prediction of gonadal sex. Endocrinol Exp 14(1):59, 1980
22. Eberlein HR: The fetal adrenal cortex. In Christy NC (ed): The Human Adrenal Cortex New York, Harper & Row, 1971,p 317
23. Gandy HM: Androgens. In: Fuchs F and Klopper A (eds): Endocrinology of Pregnancy,Second Edition. Harper & Row, 1977, p 123

24. Gurpide E and Holinka CF: Pregnancy-Related Changes in the Metabolism of Hormones, In: Tulchinsky D and Ryan KJ (eds): Maternal-Fetal-Endocrinology,Philadelphia, Saunders 1980,
25. Jütting G: Hormonale Enzyminduktion im Myometrium - Beispiel einer Östrogenwirkung am Erfolgsorgan. Acta Endocr (Kbh) Suppl 145:1, 1970
26. Katz SR, Dancis J and Levitz M: Relative Transfer of Estriol and Its Conjugates Across the Fetal Membranes in Vitro. Endocrinology 76:722, 1965
27. Ketupanya A and Wiest WG: Amniotic fluid testosterone concentration as an index of fetal sex. Pediatr Res 12(6):708, 1978
28. Klinga K, Bek E, Runnebaum B: Maternal peripheral testosterone levels during the first half of pregnancy. Am J Obstet Gynecol 131(1):60, 1978
29. Klopper A, Fuchs F: Progestagens. In: Fuchs F, Klopper A (eds): Endocrinology of Pregnancy. 2nd Ed, New York, Harper & Row, 1977 p 99
30. Lamb E, Mancuso S, Dell'Acqua S, Wiqvist N and Diczfalusy E: Studies on the metabolism of C-19 steroids in the human foeto-placental unit. I.Neutral metabolites formed from dehydroepiandrosterone sulphate by the placenta at midpregnancy. Acta endocr (Kbh) 55:263, 1967
31. Langman J: Medizinische Embryologie, Stuttgart, Thieme, 1977
32. Lebherz TB: Premature rupture of the membranes. Br Med J 1(6172):1165, 1979
33. Levitz M: Konjugation and Transfer of Fetal-Placental Steroid Hormones. J Clin Endocr 26:773, 1966
34. MacDonald PC, Schulz FM, Duenhoelter JH et al: Initiation of human parturition. I.Mechanism of action of arachidonic acid. Obstet Gynec (NY) 44(5):629, 1974
35. Magendantz HG and Ryan KJ: Isolation of an estriol precursor, 16α-hydroxydehydroepiandrosterone, from human umbilical sera. J Clin Endocr 24:1155, 1964
36. Makaveeva V, Gospodinov H: Histochemical Studies on some Hydroxysteroiddehydrogenases in Human Amnion of Women with Prolonged Pregnancy. Akusherstro i Ginekologija (Sofia) 15(4):233, 1976 (Bulg)
37. Mancuso S, Dell'Acqua S, Eriksson G, Wiqvist N and Diczfalusy E: Aromatisation of androstenedione and testosterone by human fetus. Steroids 5:183, 1965
38. Meyer AS: Conversion of 19-hydroxy-Δ^4-androstene-3.17-dione to oestrone by endocrine tissues. Biochim biophys Acta 17:441, 1955
39. Mierzejewsky W: Characteristics of time lapse between spontaneous, premature burst of amnion and delivery as an element of risky pregnancy (Pols). Ginekol Pol 50(Suppl):64,1979
40. Milewich L, Gant NF, Schwarz BE and MacDonald PC - Cecil H and Green I: Initiation of human parturition VIII. Metabolism of progesterone by fetal membranes of early and late human gestation. Obstet Gynecol 50(1):45,1977
41. Milewich L, Gant NF, Schwarz BE, Chen GT and MacDonald PC: Initiation of human parturition VII. Partial Characterisation of Progesterone metabolizing enzymes of human amnion and chorion laeve. J Steroid Biochem 11:1577, 1979
42. Mizuno M, Lobotsky J, Lloyd CW, Kobayashi T and Murasawa V: Plasma Androstenedione and Testosterone During Pregnancyand in the Newborn. J Clin Endocrinol Metab 28:1133,1968
43. Morato T, Lemus AE and Gual C: Efficiency of dehydroepiandrosterone sulphate as an estrogen precursor. Steroids 5(Suppl 1):59, 1965
44. Murphy BE: Chorionic mambrane as an extra-adrenal source of foetal cortisol in human amniotic fluid. Nature 266:179, 1977
45. Nagamani M, McDonough PG, Ellegood JO, Mahesh VB: Maternal and amniotic fluid steroids throughout human pregnancy. Am J Obstet Gynecol 134:674, 1979
46. Oshima H and Ochiai K: On testicular 17β-hydroxysteroid oxidoreductase product activation of testosterone formation from androstenedione in vitro. Biochim biophys Acta 306:227,1973
47. Pirani BBK, Pairaudeau N, Doran TA et al: Amniotic fluid testosterone in the prenatal determination of fetal sex. Am J Obstet Gynecol 129(5):518, 1977

48. Reyes FI, Winter JSD, Fairman C: Studies on human sexual development. I.Fetal gonadal and adrenal sex steroids. J Clin Endocrinol 37:74, 1973
49. Reynolds JW, Mancuso S, Wiqvist N and Diczfalusy E: Studies on the aromatisation of neutral steroids in pregnant women. 7.Aromatisation of 3β,17β-dihydroxy-androst-5-en-16one by placentas perfused in situ at midpregnancy. Acta endocr (Kbh) 58:377, 1968
50. Rivarola MA, Forest MG, Migeon CJ: Testosterone, androstenedione, and dehydroepiandrosterone in plasma during pregnancy and at delivery: concentrations and protein binding. J Clin Endocrinol 28:34, 1968
51. Robinson JD, Judd HL, Young PE, Jones OW, and Yen SSC: Amniotic Fluid Androgens and Estrogens in Midgestation. J Clin Endocrinol Metab 45(4):755, 1977
52. Rodway RG and Rahman SS: Evidence for the common identity of rabbit ovarian 20α- and 17β-hydroxysteroiddehydrogenases. J Endocr 78:459, 1977
53. Ryan KJ: Conversion of Δ^5-androstene-3β,16α,17β-triol to estriol by human placenta Endocrinology 63:392, 1958a
54. Ryan KJ: Conversion of androgens to estrogens by human placental microsomes. Fed proc 17:138, 1958b
55. Ryan KJ: Conversion of androstenedione to estrone by human placental microsomes, Biochim biophys Acta 27:658, 1958c
56. Ryan KJ: Theoretical basis for the endocrine control of gestation. A comparative approach Excerpta Med Int Congr Ser 183:120, 1969
57. Ryan KJ: Placental Synthesis of Steroid Hormones, In: Tulchinsky D and Ryan KJ (eds): Maternal-Fetal-Endocrinology, Philadelphia, Saunders, 1980 p 3
58. Saez JM and Bertrand J: Androgen studies in the foeto-placental unit, in: Pecile and Finzi: The foeto-placental-unit. Exc Medica Foundation, Amsterdam 1969 p 132
59. Schindler AE: Steroide im Fruchtwasser. Fortschritte der Geburtshilfe und Gynäkologie 46:1, 1972
60. Schwartz AL, Forster CS, Smith PA and Liggins GC: Human amnion metabolism. I. In vitro maintenance. Am J Obstet Gynecol 127(5):470, 1977
61. Schwarz BE, Milewich L, Gant NF, Porter JC, Johnston JM and MacDonald PC: Progesterone binding and metabolism in human fetal membranes. Ann NY Acad Sciences 286:304, 1977
62. Shanies DD, Hirschhorn K, New MI: Metabolism of Testosterone 14C by Cultured Human Cells J Clin Invest 51:1459, 1972
63. Strickler RC, Tobias B and Covey DF: Human Placental 17β-Estradiol Dehydrogenase and 20α-Hydroxysteroid Dehydrogenase. Two Aktivities at a Single Enzyme Active Site. J Biol Chem 256(1):316, 1981
64. Sulcova J, Jirásek JE and Stárka L: 17β-Hydroxysteroid dehydrogenase activity in human amniotic epithelium. Endokrinologie 63(2):249, 1974
65. Sulcova J, Jirásek JE, Carlstedt-Duke J, and Stárka L: 7-Hydroxylation of dehydroepiandrosterone in human amniotic epithelium. J Steroid Biochem 7:101, 1976
66. Sulcova J, Jirásek JE, Stárka L: The Conversion of Δ5-Steroids to Testosterone and Androstenedione in Human Amniotic Epithelium in vitro. Endokrinologie 70(1):6, 1977
67. Sulcova J, Jirásek JE, Dvorak P and Stárka L: The development of the androgen metabolizing activity in the human amniotic epithelium. J Steroid biochem 12:89, 1980
68. Tseng L, Gurpide E: Stimulation of Various 17β- and 20α-Hydroxysteroid Dehydrogenase Activities by Progestins in Human Endometrium. Endocrinology 104(6):1745, 1979
69. Tseng L, Gurpide E: Induction of Human Endometrial Estradiol Dehydrogenases by Progestins Endocrinology 97(4):825, 1975
70. Warne GL, Faiman C, Reyes FI and Winter JSD: Studies on Human Sexual Development. V. Concentrations of Testosterone, 17-Hydroxyprogesterone and Progesterone in Human Amniotic Fluid Throughout Gestation. J Clin Endocrinol Metab 44:934, 1977
71. Wu CH, Mennuti MT, Mikhail G: Free and protein-bound steroids in amniotic fluid of midpregnancy. Am J Obstet Gynecol 133:666, 1979

L e b e n s l a u f :

Familienname:	Häßler
Vornamen:	Reinhard Walter
Geboren:	19.12.1957
Eltern:	Wilhelm Karl Häßler (geb.: 27.01.1931) Anna-Maria Häßler geb. Plum (geb.: 31.03.1929)
Schulbildung:	Volksschule Oberammergau: 1964 - 68 Benediktinergymnasium Ettal: 1968 - 77 Abitur: Juni 1977
Berufsausbildung:	Studium der Medizin an der Ludwig - Maximilian - Universität in München 1977 - 84 Ärztliche Vorprüfung: August 1979 Staatsexamen I. Teil: August 1980 Staatsexamen II. Teil März 1983 Staatsexamen III. Teil: voraussichtlich Frühjahr 1984 Famulatur: Pädiatrie, Innere Medizin, Chirurgie (2 Monate in St. Louis USA), freies Fach im Praktischen Jahr: Anästhesie
Familienstand:	verheiratet seit: 13.10.1982 mit: Gabriele Josefa Häßler, geb. Schreck Geburt einer Tochter: 14.03.1983